

**Untersuchungen zu Mechanismen der
ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese:
Genspezifische Schäden in humanen Kolonzellen
durch endogene Risikofaktoren**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Chem. Anja Schäferhenrich
geboren am 10. Juni 1972 in Hildesheim

Gutachter:

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Ernährung und Krebs	1
1.2 Kolonkarzinogenese	2
1.2.1 Sporadischer Kolorektalkrebs.....	2
1.2.2 Adenom-Karzinom-Sequenz	4
1.2.3 Zielgene der Kolonkarzinogenese	6
1.2.3.1 APC-Gen.....	6
1.2.3.2 KRAS-Gen.....	7
1.2.3.3 TP53-Gen.....	8
1.2.4 Kolonkarzinogenese: Bottom-up oder Top-down?.....	9
1.3 Kolongewebe, Kolonkrypten und Kolonzellen	10
1.3.1 Kolongewebe und Kolonkrypten.....	10
1.3.2 Kolonkrypten und Stammzellen	10
1.3.3 Kolorektale Primärzellen und Kolonzelllinien	11
1.4 Induktion, Reparatur und Erfassung von DNS-Schäden	12
1.4.1 Induktion von DNS-Schäden.....	12
1.4.1.1 Oxidativer Stress.....	13
1.4.1.2 Lipidperoxidation.....	14
1.4.2 Reparatur von DNS-Schäden.....	16
1.4.3 Ernährung, oxidativer Stress, Lipidperoxidation und genspezifische DNS-Schäden.....	18
1.4.4 Erfassung von DNS-Schäden	22
1.4.4.1 Comet-Assay: Schäden in der Gesamt-DNS.....	22
1.4.4.2 Comet-FISH: Schäden in spezifischen Genomabschnitten.....	24
1.4.4.3 Genspezifische Schäden und Genaktivität	25
2 Problem- und Zielstellung	26
3 Material und Methoden	28
3.1 Material	28
3.1.1 Humane Kolonzellen	28
3.1.1.1 Zelllinien.....	28
3.1.1.1.1 HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen	28
3.1.1.1.2 LT97-Kolonadenomzellen	28

3.1.1.2	Primärmaterial aus Kolongewebeproben	28
3.1.1.2.1	Humane Kolonbiopsien	28
3.1.1.2.2	Humanes Kolongewebe	28
3.1.2	Testsubstanzen	29
3.1.2.1	Wasserstoffperoxid	29
3.1.2.2	Trans-2-Hexenal	29
3.1.2.3	4-Hydroxy-2-nonenal	29
3.1.3	DNS-Sonden	29
3.1.3.1	Kommerzielle Sonden	29
3.1.3.2	Nicht-kommerzielle Sonden	30
3.1.4	Sonstiges	30
3.2	Methoden	30
3.2.1	Arbeiten mit Kolonzelllinien	30
3.2.1.1	HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen	30
3.2.1.2	LT97-Kolonadenomzellen	31
3.2.2	Aufarbeitung, Aufbewahrung und Aufreinigung humaner Kolongewebeproben	32
3.2.2.1	Aufarbeitung von Kolonbiopsien	32
3.2.2.2	Aufarbeitung von Kolongewebe	33
3.2.2.3	Aufbewahrung von Primärmaterial	33
3.2.2.4	Aufreinigung der Primärzellsuspensionen	34
3.2.3	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	36
3.2.3.1	Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau	36
3.2.3.2	Vitalität mit Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid	36
3.2.3.3	Vitalität mit Fluoresceindiacetat/Trypanblau	37
3.2.4	Bestimmung der Apoptose mit Annexin V-FITC	37
3.2.5	Ansetzen der Testsubstanzen (H ₂ O ₂ , Hexenal und HNE)	38
3.2.6	Herstellung und Konzentrationsbestimmung von HNE	38
3.2.7	Induktion und Reparatur von DNS-Schäden	39
3.2.7.1	Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge	39
3.2.7.2	Reparaturversuche	40
3.2.8	Quantifizierung von Propano-dG-Addukten	41
3.2.9	Genotoxizitätstests	41
3.2.9.1	Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay	42
3.2.9.2	Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH	44
3.2.10	Karyotypisierung der HT29clone19a- und LT97-Zellen mittels 24-Farben-FISH	47
3.2.11	Statistik	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Aufarbeitung, Aufbewahrung und Aufreinigung humaner Kolongewebeproben	48
4.1.1	Aufarbeitung von Kolonbiopsien und Kolongewebe	48
4.1.1.1	Kolonbiopsien	48
4.1.1.1.1	Gewinnung von Kolonkrypten	48

4.1.1.1.2	Gewinnung von primären Kolonzellen	48
4.1.1.2	Kolongewebe	49
4.1.1.2.1	Gewinnung von Kolonepithelstreifen	49
4.1.1.2.2	Gewinnung von Kolonkrypten	49
4.1.1.2.3	Gewinnung von primären Kolonzellen	50
4.1.1.3	Vergleich der Aufarbeitung von Kolonbiopsien und Kolongewebe	50
4.1.2	Aufbewahrung von Primärmaterial	51
4.1.2.1	Kurzfristige Aufbewahrung	51
4.1.2.1.1	Aufbewahrung von primären Kolonzellen	51
4.1.2.1.2	Aufbewahrung von Kolonkrypten	51
4.1.2.1.3	Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen	51
4.1.2.2	Langfristige Aufbewahrung	51
4.1.2.2.1	Einfrieren und Auftauen von primären Kolonzellen	51
4.1.2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Kolonepithelstreifen	52
4.1.3	Einfluss von Aufarbeitung und Aufreinigung auf Vitalität und DNS-Basisschäden	54
4.1.3.1	Dauer des Enzymverdaus	54
4.1.3.2	Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation	55
4.1.3.3	Magnetische Zellseparation	57
4.1.4	Bestimmung von Vitalität und Apoptose	58
4.1.4.1	Vergleichende tot-vital-Färbungen in primären Kolonzellen und Krypten	58
4.1.4.2	Bestimmung der Apoptose in Kolonkrypten mit Annexin V-FITC	60
4.2	Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay	60
4.2.1	HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen	60
4.2.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge	60
4.2.1.2	Reparatur der DNS-Schäden	61
4.2.2	Primäre Kolonzellen	63
4.2.2.1	Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge	63
4.2.2.2	Reparatur der DNS-Schäden	64
4.2.3	LT97-Zellen	66
4.2.3.1	Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge	66
4.2.3.2	Reparatur der DNS-Schäden	67
4.2.4	Vergleich der Testsubstanzen	68
4.2.4.1	Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge	68
4.2.4.2	Reparaturversuche	68
4.2.5	Vergleich der verwendeten Zellen	68
4.2.5.1	HT29clone19a- und LT97-Zellen	68
4.2.5.2	HT29clone19a-, LT97- und Primärzellen	70
4.2.6	Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf HNE-induzierte DNS-Schäden	71
4.2.7	Untersuchungen zur Reparatur HNE-induzierter DNS-Schäden: Quantifizierung von Propano-DNS-Addukten	72
4.2.8	Untersuchung H ₂ O ₂ - bzw. HNE induzierter Schäden im alkalischen und neutralen Comet-Assay	73
4.2.9	Untersuchung des Einflusses der Zellwachstumsdauer auf Hexenal-induzierte DNS-Schäden	75

4.3	Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH.....	76
4.3.1	Karyotypisierung der HT29clone19a- und LT97-Zellen.....	76
4.3.1.1	HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen.....	77
4.3.1.2	LT97-Kolonadenomzellen.....	77
4.3.2	Generelle DNS-Schäden in den Comet-FISH-Versuchen.....	78
4.3.3	Hybridisierungseffizienz in den Comet-FISH-Versuchen.....	80
4.3.4	Lokalisierung der FISH-Signale innerhalb der Zellen.....	80
4.3.5	Spezifische Schäden im <i>APC</i> -, <i>KRAS</i> - bzw. <i>TP53</i> -Gen.....	81
4.3.5.1	Primäre Kolonzellen.....	81
4.3.5.2	LT97-Kolonadenomzellen.....	88
4.3.5.3	Zusammenfassung.....	94
4.3.6	Vergleich der untersuchten Gene.....	95
4.3.7	Vergleich der verwendeten Zellen.....	98
4.3.8	Gebrochene Signale in den Comet-FISH-Versuchen.....	101
4.3.9	Zwei-Farben- und Drei-Farben-FISH-Versuche.....	102
4.3.10	Comet-FISH-Versuche mit Ganzchromosomenproben.....	103
5	<i>Diskussion</i>.....	104
5.1	Zell- und Kryptisolierung aus Gewebeproben.....	104
5.2	Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay.....	111
5.3	Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH.....	122
6	<i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>.....	130
6.1	Schlussfolgerungen.....	130
6.2	Ausblick.....	133
7	<i>Zusammenfassung</i>.....	136
	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	139
	<i>Anhang</i>.....	153
	Anhang I: Material.....	153
	Anhang II: Tabellen.....	159
	Anhang III: Abbildungen.....	167

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland im Jahr 2001 [Statistisches Bundesamt, 2003].....	1
Abbildung 2: Die häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 1998. Prozentualer Anteil an den Krebsneuerkrankungen in allen Altersbereichen [Robert Koch Institut, 2003].....	1
Abbildung 3: Ursachen für die Bildung von Darmtumoren nach Potter [1999].....	2
Abbildung 4: Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein zeigt die mit den verschiedenen Stufen der Kolonkarzinogenese verbundenen genetischen Veränderungen [Fearon und Vogelstein, 1990].....	5
Abbildung 5: Querschnitt durch das Darmlumen nach Alberts et al. [1994].....	10
Abbildung 6: Querschnitt durch eine Kolonkrypte mit Stammzellen, Proliferationszone und ausdifferenzierten Zellen.	11
Abbildung 7: Entstehung von Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen nach Marquart und Schäfer [2004].....	13
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Lipidperoxidation nach Santanam et al. [1998].	15
Abbildung 9: Strukturformeln von a) trans-2-Hexenal und b) 4-Hydroxy-2-nonenal.	16
Abbildung 10: Beispiel einer ungeschädigten, geschädigten und stark geschädigten HT29clone19a-Zelle.....	23
Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Kolonkrypten a) direkt nach der Isolierung und b) nach 6 h bei Raumtemperatur.	50
Abbildung 12: Vitalität eingefrorener und wieder aufgetauter Primärzellen nach Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Wiederauftauen.	52
Abbildung 13: Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen, die aus eingefrorenen Kolonepithelstreifen isoliert wurden. Vergleich von Einfriermedium 1 und 2.....	53
Abbildung 14: Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen, die aus eingefrorenen Kolonepithelstreifen isoliert wurden. Einfluss von Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate.	54
Abbildung 15: Einfluss des Enzymverdaus auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen. Vergleich von direkt aufgearbeitetem mit über Nacht aufbewahrtem Kolonepithel.	55
Abbildung 16: Einfluss von Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen. Vergleich von direkt aufgearbeitetem und über Nacht aufbewahrtem Kolonepithel.....	56
Abbildung 17: Einfluss von Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen.....	57
Abbildung 18: Vergleich verschiedener tot-vital-Färbungen. Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau, FDA/Ethidiumbromid sowie FDA/Trypanblau.	58
Abbildung 19: Mit FDA/Ethidiumbromid gefärbte a) HT29clone19a-Zellen bzw. b) primäre Kolonzellen sowie mit FDA/Trypanblau gefärbte c) HT29clone19a-Zellen bzw. d) primäre Kolonzellen.....	59
Abbildung 20: Mit FDA/Ethidiumbromid angefärbte Kolonkrypten.	59
Abbildung 21: Schädigung von HT29clone19a-Zellen mit a) 0-150 µM H ₂ O ₂ , b) 0-1600 µM Hexenal bzw. c) 0-250 µM HNE.....	61
Abbildung 22: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch 150 µM H ₂ O ₂ (0-120 min Reparatur).	62
Abbildung 23: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch 400 µM Hexenal (0-120 min Reparatur).	62

<i>Abbildung 24: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch 150 µM HNE (0-120 min Reparatur).</i>	63
<i>Abbildung 25: Schädigung von Primärzellen mit a) 0-150 µM H₂O₂, b) 0-1600 µM Hexenal bzw. c) 0-250 µM HNE.</i>	64
<i>Abbildung 26: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 150 µM H₂O₂ (0-120 min Reparatur).</i>	65
<i>Abbildung 27: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 400 µM Hexenal (0-120 min Reparatur).</i>	65
<i>Abbildung 28: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 150 µM HNE (0-120 min Reparatur).</i>	66
<i>Abbildung 29: Schädigung von LT97-Zellen mit a) 0-150 µM H₂O₂, b) 0-1600 µM Hexenal bzw. c) 0-250 µM HNE.</i>	67
<i>Abbildung 30: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-150 µM H₂O₂.</i>	69
<i>Abbildung 31: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-1600 µM Hexenal.</i>	69
<i>Abbildung 32: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-250 µM HNE.</i>	70
<i>Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der Sensitivitäten von HT29clone19a-, LT97- und primären Kolonzellen. Schädigung durch a) 0-150 µM H₂O₂, b) 0-1600 µM Hexenal bzw. c) 0-250 µM HNE.</i>	71
<i>Abbildung 34: Charakterisierung der durch 0-150 µM H₂O₂ in HT29clone19a-Zellen induzierten DNS-Schäden im alkalischen bzw. neutralen Comet-Assay.</i>	74
<i>Abbildung 35: Charakterisierung der durch 0-250 µM HNE in HT29clone19a-Zellen induzierten DNS-Schäden im alkalischen bzw. neutralen Comet-Assay.</i>	75
<i>Abbildung 36: Einfluss der Wachstumsdauer der Zellen auf die im Comet-Assay gemessenen DNS-Schäden. Schädigung von HT29clone19a-Zellen mit 400 µM Hexenal (0-30 min Reparatur).</i>	76
<i>Abbildung 37: Zuordnung der Zellen zu den vier Schädigungskategorien. Beispielhaft sind H₂O₂-geschädigte Zellen abgebildet, die den Kategorien 1, 2, 3 bzw. 4 entsprechen.</i>	78
<i>Abbildung 38: H₂O₂-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.</i>	79
<i>Abbildung 39: Hexenal-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.</i>	79
<i>Abbildung 40: HNE-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.</i>	80
<i>Abbildung 41: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in Kometenkopf und/ oder Kometenschweif.</i>	81
<i>Abbildung 42: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	82
<i>Abbildung 43: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	83
<i>Abbildung 44: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	83

<i>Abbildung 45: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 46: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 47: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 48: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 49: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 50: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>88</i>
<i>Abbildung 51: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 52: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 53: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 54: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 55: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.</i>	<i>91</i>
<i>Abbildung 56: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der KRAS-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 57: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 58: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 59: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.....</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 60: H₂O₂-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.....</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 61: Hexenal-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 62: HNE-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 63: Vergleich der APC-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach HNE-Inkubation.</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 64: Vergleich der KRAS-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach H₂O₂-Inkubation.....</i>	<i>99</i>
<i>Abbildung 65: Vergleich der KRAS-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach HNE-Inkubation.</i>	<i>100</i>

<i>Abbildung 66: Vergleich der TP53-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach H₂O₂-Inkubation.....</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 67: Gebrochene Hybridisierungssignale in einer a) HNE-geschädigten LT97-Zelle (TP53), b) H₂O₂-geschädigten LT97-Zelle (APC), c) HNE-geschädigten primären Kolonzelle (KRAS) bzw. d) Hexenal-geschädigten primären Kolonzelle (TP53).....</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 69: Aufnahme einer a) unbehandelten primären Kolonzelle bzw. b) LT97-Zelle, die mit TP53- (rote Signale), APC- (grüne Signale) und KRAS-Sonden (rot-grüne Signale) hybridisiert wurde (Drei-Farben-FISH).....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 68: Aufnahmen unbehandelter primärer Kolonzellen, die mit a) TP53- (rote Signale) und APC-Sonden (grüne Signale) bzw. b) TP53- (rote Signale) und KRAS-Sonden (grüne Signale) hybridisiert wurden (Zwei-Farben-FISH).....</i>	<i>102</i>
<i>Abbildung 70: Vergleich von DMSO- und Ethanol als Lösungsmittel für HNE. Schädigung von HT29clone19a-Zellen.....</i>	<i>167</i>
<i>Abbildung 71: Vergleich von DMSO- und Ethanol als Lösungsmittel für HNE. Schädigung von primären Kolonzellen.</i>	<i>167</i>
<i>Abbildung 72: Propano-dG-Addukte während der Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung mit 150 µM HNE (0-120 min Reparatur). Zusammenfassung von Versuchen, die mit Ethanol- bzw. DMSO-gelöstem HNE durchgeführt wurden.</i>	<i>168</i>
<i>Abbildung 73: Falschfarbendarstellung einer Metaphase der HT29clone19a-Zelllinie (24-Farben-FISH) [Kuechler et al., 2003].....</i>	<i>168</i>
<i>Abbildung 74: Falschfarbendarstellungen von Metaphasen der beiden in gleichen Teilen in der LT97-Zelllinie vorliegenden Klone (24-Farben-FISH) [Schaeferhenrich et al., 2003b].....</i>	<i>169</i>

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: Farbkombinationen zur Unterscheidung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen.</i>	37
<i>Tabelle 2: Übersicht über die zur Erfassung von Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhängen eingesetzten Modellsubstanzen.</i>	39
<i>Tabelle 3: Übersicht über die bei den Reparaturversuchen eingesetzten Modellsubstanzen.</i>	40
<i>Tabelle 4: Übersicht über die durchgeführten Comet-Assay- und Comet-FISH-Versuche.</i>	42
<i>Tabelle 5: Vergleichende Gegenüberstellung von Kolonbiopsie- und Kolongewebeaufarbeitung.</i>	50
<i>Tabelle 6: Übersicht über die durch Schädigung humaner Kolonprimärzellen mit 150 µM HNE (in DMSO gelöst) induzierten Propano-dG-Addukte [Addukte/ 10⁹ Nukleotide].</i>	73
<i>Tabelle 7: Übersicht über die durch Schädigung humaner Kolonprimärzellen mit 150 µM HNE (in EtOH gelöst) induzierten Propano-dG-Addukte [Addukte/ 10⁹ Nukleotide].</i>	73
<i>Tabelle 8: Tabellarische Übersicht über die Comet-FISH-Versuche (ohne Zwei- bzw. Drei-Farben-FISH- Versuche).</i>	76
<i>Tabelle 9: Übersicht über die genspezifischen Schäden im APC-, KRAS- und TP53-Gen.</i>	95
<i>Tabelle 10: Übersicht über die spezifische Sensitivität des APC-, KRAS- bzw. TP53-Gens.</i>	98
<i>Tabelle 11: Übersicht über die genspezifische Sensitivität von LT97- und primären Kolonzellen.</i>	101
<i>Tabelle 12: GST/GSH-Status der HT29clone19a-, LT97- und primären Kolonzellen.</i>	121
<i>Tabelle 13: Genspezifische und generelle DNS-Schäden in den untersuchten Kolonzellen.</i>	127
<i>Tabelle 14: Auswertung der Patientendatenblätter (Kolonbiopsien).</i>	159
<i>Tabelle 15: Auswertung der Patientendatenblätter (Kolongewebeproben).</i>	159
<i>Tabelle 16: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	160
<i>Tabelle 17: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	161
<i>Tabelle 18: HNE-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	161
<i>Tabelle 19: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	161
<i>Tabelle 20: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	161
<i>Tabelle 21: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.</i>	161
<i>Tabelle 22: Hybridisierungsgüte [%] in H₂O₂-geschädigten primären Kolonzellen.</i>	162
<i>Tabelle 23: Hybridisierungsgüte [%] in Hexenal-geschädigten primären Kolonzellen.</i>	162
<i>Tabelle 24: Hybridisierungsgüte [%] in HNE-geschädigten primären Kolonzellen.</i>	162
<i>Tabelle 25: Hybridisierungsgüte [%] in H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen.</i>	162
<i>Tabelle 26: Hybridisierungsgüte [%] in Hexenal-geschädigten LT97-Zellen.</i>	162
<i>Tabelle 27: Hybridisierungsgüte [%] in HNE-geschädigten LT97-Zellen.</i>	163
<i>Tabelle 28: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.</i>	163
<i>Tabelle 29: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.</i>	163
<i>Tabelle 30: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.</i>	163
<i>Tabelle 31: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.</i>	163

<i>Tabelle 32: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 33: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 34: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 35: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 36: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>164</i>
<i>Tabelle 37: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 38: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 39: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 40: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 41: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>165</i>
<i>Tabelle 42: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelle 43: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelle 44: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>166</i>
<i>Tabelle 45: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.....</i>	<i>166</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin	HT29clone19a	aus HT29-Zellen rück-differenzierte Kolonzelllinie
APC	Adenomatous Polyposis Coli	kb	Kilobasen
BER	Basenexzisionsreparatur	kDa	Kilodalton
C	Cytosin	KRAS	Kirsten rat sarcoma
CaCo2	humane Kolonadenokarzinom-zelllinie	LMA	Low-melting Agarose
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan	LT97	humane Kolonadenomzelllinie
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid	MCC	Mutated in Colon Cancer
DCC	Deleted in Colon Cancer	MCDB	Zellkulturmedium
dd H₂O	doppelt destilliertes Wasser	MDA	Malondialdehyd
dig	Digoxygenin	MMR	Mismatch Repair
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	mRNA	messenger RNA
DMSO	Dimethylsulfoxid	MW	Mittelwert
DNAse	Desoxyribonuclease	n	Anzahl der Versuchswiederholungen
DNS	Desoxyribonukleinsäure	Na₂EDTA	Natrium Ethylendiamintetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NER	Nukleotidexzisionsreparatur
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor	NHEJ	Non homologous end-joining
EGTA	Ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	NMA	Normal-melting Agarose
EtOH	Ethanol	OT	Objektträger
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
FCS	Fötales Kälberserum	PCR	Polymerasekettenreaktion
FDA	Fluoresceindiacetat	PenStrep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	RNAse	Ribonuclease
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
G	Guanin	rpm	Umdrehung pro Minute
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie	RPMI	Zellkulturmedium
GSH	reduziertes Glutathion	RT	Raumtemperatur
GST	Glutathion-S-Transferase	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
H₂O₂	Wasserstoffperoxid	SD	Standardabweichung
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution	SMAD2/4	Tumorsuppressorgene
Hexenal	trans-2-Hexenal	SSC	Saline Sodium Citrate
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal	T	Thymin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	TI	Tail-Intensity
HT29	humane Kolonkarzinomzelllinie	TP53	Tumor Protein 53
		V97	Chinesische Hamster Lungenfibroblasten-Zelllinie

1 EINLEITUNG

1.1 Ernährung und Krebs

Die Zahl der Krebsneuerkrankungen lag weltweit im Jahr 2000 bei etwa 10 Millionen Fällen. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht jedoch davon aus, dass die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bis zum Jahr 2020 um 50 % auf 15 Millionen steigen könnte. Weltweit waren Krebserkrankungen im Jahr 2000 für 12 % der gesamten Todesfälle verantwortlich, wobei dieser

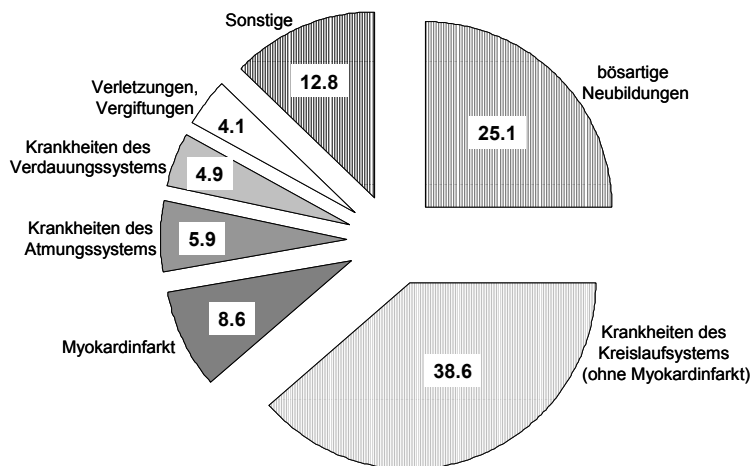


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland im Jahr 2001 [Statistisches Bundesamt, 2003].

prozentuale Anteil in vielen Industrienationen weitaus höher lag [WHO, 2003]. So ließen sich in Deutschland im Jahr 2001 mehr als ein Viertel der jährlichen Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückführen, womit diese die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellten [Statistisches Bundesamt, 2003] (Abbildung 1).

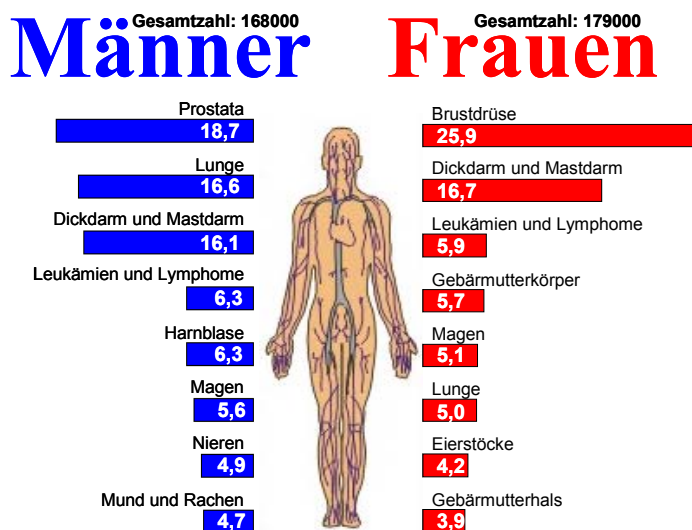


Abbildung 2: Die häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland im Jahr 1998. Prozentualer Anteil an den Krebsneuerkrankungen in allen Altersbereichen [Robert Koch Institut, 2003].

Die Zahl der in jedem Jahr in Deutschland auftretenden Krebsneuerkrankungen wird auf 350.000 geschätzt und allein im Jahr 1999 starben 210.000 Menschen an den Folgen einer Tumorerkrankung [Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002].

Wie bei den meisten Krebserkrankungen sind auch beim Kolorektalkrebs die höchsten Inzidenzraten in den westlichen Industrienationen zu finden [GLOBOCAN 2000, 2001]. So ist Kolorektalkrebs in Deutschland bei Frauen die zweithäufigste und bei Männern die dritthäufigste maligne Erkrankung. Dabei lag 1998 die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen für Frauen bei 30.000 und für Männer bei über 27.000 Fällen (Abbildung 2). Mit diesen Zahlen befand sich die

altersstandardisierte Inzidenzrate für Deutschland im europaweiten Durchschnitt [Robert Koch Institut, 2003].

1.2 Kolonkarzinogenese

Bei der Etiologie der Kolontumore unterscheidet man zwischen vererbbaaren und sporadischen Formen. Zu den erblich bedingten Formen des Dickdarmkrebses werden die Familiäre Adenomatöse Poliposis (FAP) und das nichtpolipöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) gezählt, die zusammen allerdings nur 4-6 % aller auftretenden Kolontumore ausmachen. Weiterhin müssen die aufgrund chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen oder aufgrund von Enzypolymorphismen entstandenen Tumore zu den hereditären Kolonkarzinomen gezählt

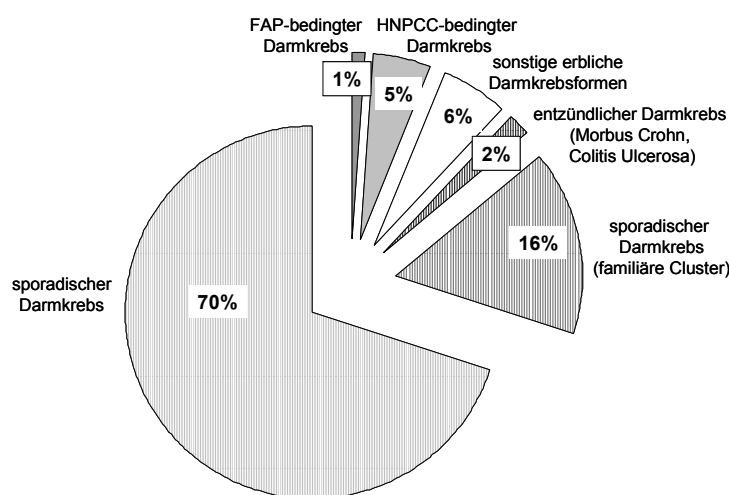


Abbildung 3: Ursachen für die Bildung von Darmtumoren nach Potter [1999].

werden [Potter, 1999]. Die weitaus meisten Kolontumore entwickeln sich jedoch sporadisch, indem sich ohne genetische Prädisposition über lange Zeiträume hinweg gesunde Körperzellen in Krebszellen verwandeln. Diese machen etwa 85 % der gesamten kolorektalen Krebserkrankungen aus

(Abbildung 3) [Potter, 1999].

1.2.1 Sporadischer Kolorektalkrebs

Zu den Risikofaktoren für Dickdarmkrebs gehören neben genetischer Prädisposition vor allem individuelle Faktoren des jeweiligen Lebensstils. So wurde 1981 erstmals von Doll und Peto gezeigt, dass Lebensstil und Ernährung für etwa 50 ± 30 % aller Krebserkrankungen verantwortlich sind [Doll und Peto, 1981]. Inzwischen geht der World Cancer Research Fund (WCRF) davon aus, dass bei Dickdarmtumoren 66-75 % der Todesfälle durch Ernährungsumstellung vermieden werden könnten [WCRF, 1997]. Diese Aussage lässt sich vor allem durch epidemiologische Studien stützen, die eine erhöhte Krebsinzidenz bei einer „Western Style Diet“ zeigen [Bonithon-Kopp und Benhamiche, 1999; Joossens und Kesteloot, 2001; La Vecchia et al., 2003].

Die „Western Style Diet“ zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Fleisch, tierischen Fetten und raffinierten Kohlenhydraten (Zucker und Stärke) aus und ist arm an Obst und Gemüse sowie Ballaststoffen [Slattery, 2000]. Speziell der Verzehr von rotem Fleisch (Rind und Schwein) ist

mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert. Als Ursache wird dabei der erhöhte Gehalt an Eisen im Fäzes angesehen, das via Fenton-Reaktion zur verstärkten Bildung von Hydroxylradikalen und oxidativen DNS-Schäden führt [Nelson, 2001; Norat et al., 2002]. Eine hohe Gesamtfettaufnahme ist nur in einigen epidemiologischen Studien mit einem höheren Darmkrebsrisiko verbunden [Slattery, 2000], wobei vor allem tierische Fette das Risiko steigern [Slattery et al., 1997]. Darüber hinaus spielen auch endogene Lipidperoxidationsprodukte eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung [Esterbauer et al., 1990]. Ein zu geringer Verzehr von Obst, Gemüse und Getreideprodukten gilt ebenfalls als krebsrisikoerhöhend, da es dadurch zu einer Unterversorgung mit Ballaststoffen und wichtigen antikarzinogenen Mikronährstoffen, wie z. B. Folsäure, kommt. Vor allem in Kombination mit einer fleisch- und fettreichen Ernährung führt ein geringer Obst- und Gemüseverzehr zu einem gesteigerten Risiko an Kolorektalkrebs zu erkranken. So fanden Rieger et al. nach einer solchen Diät ein signifikant erhöhtes genotoxisches Potential im Fäzeswasser [Rieger et al., 1999]. Auch eine Ernährung mit hohem Anteil an raffinierten Kohlenhydraten ist positiv mit der Entstehung von Darmtumoren assoziiert. Hier ist es vor allem eine saccharosereiche Ernährung, die zu einem erhöhten Plasmainsulinspiegel und langfristig, vor allem bei übermäßiger Energiezufuhr, zu Insulinresistenz und einer dauerhaften Stimulation der Zellproliferation führen kann [Bruce et al., 2000]. Als weitere Risikofaktoren des individuellen Lebensstils sind neben Alkoholkonsum [Tiemersma et al., 2003] und Rauchen [Sharpe et al., 2002] auch Übergewicht und mangelnde Bewegung [Boutron-Ruault et al., 2001; Slattery und Potter, 2002] zu nennen.

Zu den wichtigsten protektiven Faktoren zählen dementsprechend ein hoher Obst-, Gemüse- und Ballaststoffverzehr [Norat und Riboli, 2002; Bingham et al., 2003; Peters, 2003]. Hinsichtlich der Ballaststoffzufuhr wiesen sowohl die prospektive Studie von Bingham et al. [2003] als auch die Fall-Kontroll-Studie von Peters [2003] eine inverse Beziehung zwischen Ballaststoffaufnahme und dem Risiko Kolonadenome bzw. -karzinome zu entwickeln auf. Dabei ist zum einen die Höhe der Gesamtaufnahme und zum anderen die Art der aufgenommenen Ballaststoffe von entscheidender Bedeutung. So wirkt sich eine hohe Zufuhr von Weizenkleie, Fructooligosacchariden und resistenter Stärke im Rahmen einer gesunden Ernährung protektiv auf die kolorektale Karzinogenese aus [Pool-Zobel et al., 2002; Bingham et al., 2003; Peters, 2003; Berlau et al., 2004]. Zu den protektiv wirksamen Mechanismen von Ballaststoffen wird vor allem die Verdünnung karzinogen wirksamer Substanzen im Fäzes und die Verkürzung der Transitzeit im Kolon durch Zunahme des Stuhlvolumens gezählt. Zudem werden Gallensäuren und andere potentiell toxische Stoffe gebunden, wodurch ebenfalls die Exposition der Kolonmukosa mit Karzinogenen vermindert wird [Kim und Mason, 1996]. Ferner werden Ballaststoffe von der intestinalen Bakterienflora zu kurzkettigen Fettsäuren fermentiert, von denen vor allem Butyrat eine antikarzinogene Wirkung besitzt [Pool-Zobel et al., 2002]. Obst

und Gemüse stellen jedoch nicht nur eine Quelle für Ballaststoffe dar, sondern versorgen den Organismus auch mit den antioxidativ wirksamen Vitaminen A, C und E sowie mit sekundären Pflanzenstoffen (Carotinoide, Isothiocyanate, Polyphenole u.a.), die für die antikarzinogene Wirkung von Obst und Gemüse verantwortlich gemacht werden [Slattery, 2000].

Als weitere ernährungsrelevante Faktoren werden Calcium und Vitamin D angesehen, wobei Calcium die Proliferation des Kolonepithels inhibiert, auf welche Vitamin D als Regulator der Kalziumhomöostase ebenfalls einen inhibierenden Einfluss hat. Zudem wirkt Calcium protektiv, indem es freie Gallen- und Fettsäuren im Fäzes bindet und das Wachstum von Kolontumorzellen unterdrückt [Kim und Mason, 1996].

1.2.2 Adenom-Karzinom-Sequenz

Die Tumorentstehung ist ein Mehrstufenprozess, bei dem sich über lange Zeiträume hinweg normale Körperzellen zu Krebszellen verändern. Diese Zeitspanne der Tumorentstehung wird in Initiation, Promotion und Progression unterteilt und beinhaltet verschiedene Schritte auf molekularer und auf Gewebeebene, die sich an die erste initiiierende Mutation anschließen [Mendelsohn, 2001].

Bei der **Initiation** verursachen exogene und/ oder endogene Faktoren eine irreversible, nichtletale DNS-Veränderung in einer Zelle, die an die nachfolgende Zellgeneration weitergegeben und somit als Mutation manifest wird. Während der **Promotions**phase bewirken sogenannte Promotoren eine beschleunigte Proliferation der initiierten Zellen, wodurch es jedoch in diesem Stadium nicht zwangsläufig zu einer malignen Entartung der Zellen kommt. Meist erfolgt die Ausbildung von gutartigen Läsionen oder Präneoplasien, die allerdings das Risiko einer malignen Entartung in sich tragen. Die **Progression** führt im Weiteren zu einer Umwandlung des benignen in einen malignen Tumor. Mit fortschreitender Tumormalignität kommt es zu zunehmender Heterogenität und Autonomie des Tumors, verbunden mit infiltrierendem Wachstum und **Metastasierung** [Mendelsohn, 2001].

Für die Kolonkarzinogenese war es das Mehrstufenmodell von Fearon und Vogelstein [1990], das erstmals die beim Kolonkrebs auftretenden histologischen und morphologischen Veränderungen mit den gefundenen genetischen Veränderungen in Zusammenhang brachte. Das auch als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnete Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese veranschaulicht diesen mehrstufigen Prozess, der als Serie aufeinanderfolgender Mutationen aufgefasst werden kann [Kinzler und Vogelstein, 1996; Lengauer et al., 1997; Lengauer et al., 1998]. Die genetischen Veränderungen ereignen sich dabei in solchen Genen, die für Zellwachstum, Zelldifferenzierung, DNS-Reparatur und Interaktionen zwischen zellulärer und extrazellulärer Matrix zuständig sind. Zu den von Fearon und Vogelstein genannten Mutationen zählen Veränderungen im *APC*-Gen (adenomatous polyposis coli, 5q21-q22), im *KRAS*-Gen (kirsten rat sarcoma, 12p12.1), im *MCC*-Gen (mutated in colon cancer, 5q21-22) und im *TP53*-

Gen (tumour protein 53, 17p13.1). Hinzu kommen Veränderungen im *SMAD2/SMAD4*- (18q21.1) [Hahn et al., 1996; Takagi et al., 1998] bzw. *DCC*-Gen (deleted in colorectal cancer, 18q21.3) [Fearon et al., 1990] (Abbildung 4).

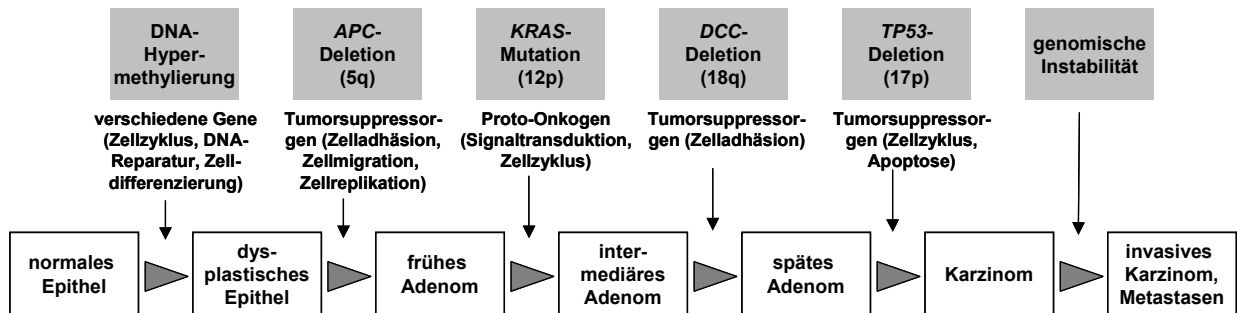


Abbildung 4: Die Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein zeigt die mit den verschiedenen Stufen der Kolonkarzinogenese verbundenen genetischen Veränderungen [Fearon und Vogelstein, 1990].

Die zeitliche Reihenfolge, in der diese Mutationen aufeinander folgen, variiert, wobei zumeist eine somatische Mutation im *APC*-Gen das initiiierende Ereignis darstellt. So werden *APC*-Mutationen bereits in aberranten Kryptfoci und in Adenomen mit einem Durchmesser $< 0,5$ cm gefunden [Leslie et al., 2002]. Die nachfolgende Schädigung trifft mit *KRAS* ein Onkogen, das zu der *RAS*-Genfamilie zählt und dessen Genprodukte für die Regulierung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung wichtig sind. So weisen Adenome mit *KRAS*-Mutationen ein schnelleres Wachstum und eine schnellere Dysplasiebildung auf, woraus gefolgert werden kann, dass Veränderungen in diesem Gen die Progression eines kleinen Adenoms mit geringer Malignität in ein größeres mit höherer Malignität ermöglichen [Macaluso et al., 2002]. Dass es sich bei den *KRAS*-Mutationen um relativ frühe Ereignisse der Tumorgenese handelt [Vogelstein et al., 1988; Fearon und Vogelstein, 1990], lässt sich daran erkennen, dass Veränderungen in einem der *KRAS*-Gene nur mit einer Häufigkeit von etwa 10 % in Adenomen mit einem Durchmesser $< 0,5$ cm vorkommen, sich aber in etwa 50 % der größeren Adenome (> 1 cm) und Karzinome nachweisen lassen [Vogelstein et al., 1988; Fearon, 1994]. Das nächste genetische Ereignis der Adenom-Karzinom-Sequenz ist der Verlust des 18q-Allels, der selten in frühen Adenomstadien, aber in etwa 50 % der späten Adenome und in 70 % der kolorektalen Karzinome gefunden wird. Auf diesem Allel wurde das *DCC*-Gen identifiziert [Fearon et al., 1990; Fearon, 1994], dessen Verlust wahrscheinlich zu Veränderungen der Zelladhäsion in der gesunden Kolonmukosa führt. Weitere Tumorsuppressorgene, die ebenfalls auf 18q liegen, sind *SMAD2* und *SMAD4* [Hahn et al., 1996; Takagi et al., 1998], die unter anderem für Zellwachstum, Zellproliferation und Zelldifferenzierung verantwortlich sind [Heldin et al., 1997; Duff und Clarke, 1998]. Als letztes Ereignis tragen Veränderungen im *TP53* schließlich zu der malignen Entartung der Adenome bei. So ist das *TP53*-Gen in kolorektalen Karzinomen häufig durch Mutationen oder Verlust der Heterozygose inaktiviert, während es in kolorektalen

Adenomen nur selten verändert ist. In Kolontumoren weisen etwa 75-85 % der malignen Karzinome *TP53*-Mutationen auf [Baker et al., 1990].

Das Modell von Fearon und Vogelstein ist in den letzten Jahren durch eine Vielzahl von Publikationen gestützt und weiter ausgebaut worden [Leslie et al., 2002; Renehan et al., 2002]. Gleichmaßen sind aber auch alternative Entstehungswege der Kolonkarzinogenese entdeckt und beschrieben worden. Dies ist zum einen die Genetische-Instabilität-Karzinom-Sequenz, bei der die Basenfehlpaarungsreparatur (mismatch repair; MMR) geschädigt ist [Jass et al., 2002; Jiricny und Marra, 2003] und zum anderen die auf entzündlichen Darmerkrankungen beruhende Dysplasie-Karzinom-Sequenz [Munkholm, 2003]. Die genannten Wege der Karzinogenese sind sowohl bei vererbtem als auch bei sporadischem Kolorektalkrebs gefunden worden. Ihre Gemeinsamkeit besteht darin, dass die Genexpression von Schlüsselgenen durch ererbte und/oder erworbene Mutationen oder durch Hypermethylierung verändert bzw. verloren gegangen ist und es dadurch zu beschleunigtem Zellwachstum und schließlich zur Tumorbildung kommt. Zudem kommt es in allen Modellen mit zunehmender Malignität der kolorektalen Tumore zu einer Anhäufung einzelner Mutationen [Potter, 1999; Arends, 2000; Smith et al., 2002].

1.2.3 Zielgene der Kolonkarzinogenese

Im Folgenden sollen mit dem *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen die wichtigsten Gene der Adenom-Karzinom-Sequenz eingehender beschrieben werden.

1.2.3.1 *APC*-Gen

Mutationen des *APC*-Gens stellen die initiiierenden Ereignisse der kolorektalen Karzinogenese dar. Aus diesem Grund wird das *APC*-Gen auch Pfortner (gatekeeper) der kolorektalen Karzinogenese genannt. Das *APC*-Gen wurde im Jahre 1987 unabhängig von Leppert et al. [1987] und Bodmer et al. [1987] auf Chromosom 5q21-q22 lokalisiert und vier Jahre später sequenziert [Grodin et al., 1991]. *APC*-Mutationen werden in etwa 60-80 % der sporadischen kolorektalen Adenome und Karzinome gefunden [Vogelstein et al., 1988; Miyaki et al., 1994]. Bei diesen Mutationen handelt es sich vor allem um Frameshift- und Nonsense-Mutationen, die in einem relativ kleinen Bereich des *APC*-Gens, zwischen Kodon 1280 und 1500, auftreten. Während die *APC*-Mutationen in allen Stadien der kolorektalen Kanzerogenese mit gleicher Häufigkeit auftreten, nimmt der Verlust des *APC*-Allels in seiner Häufigkeit von frühem Adenom zu invasivem Karzinom hin zu [Miyaki et al., 1994].

Das Produkt des *APC*-Gens ist ein 312 kDa großes Protein, das aus 2843 Aminosäuren besteht. Es liegt in den Zellen verschiedener epithelialer Gewebe vor, wo es meist diffus im Zytoplasma verteilt ist. In der kolorektalen Mukosa wird *APC* im oberen Teil der Krypten verstärkt expremiert und scheint hier ursächlich mit der Adhäsion und Migration bzw. mit der Differenzierung und Apoptose der Zellen verknüpft zu sein [Fodde et al., 2001]. Die genauen

Funktionszusammenhänge erschließen sich aus dem Wnt- β -Catenin-Signalweg, in den das *APC*-Protein involviert ist. Wildtyp *APC* bildet mit β -Catenin und GSK-3 β einen *APC*- β -Catenin-GSK-3 β -Komplex. Dieser reguliert die β -Catenin-Konzentration, indem er zur spezifischen Phosphorylierung und damit zur beschleunigten Zersetzung des β -Catenins führt (Ubiquitin-Proteasom-Reaktionsweg). Wenn sich der *APC*- β -Catenin-GSK-3 β -Komplex aufgrund unzureichend exprimierter bzw. veränderter *APC*-Proteine nicht ausbilden kann, unterbleibt die Phosphorylierung und Zersetzung des β -Catenins, das im Zytoplasma akkumuliert und auf zwei Wegen abreagiert. Zum einen bindet es zusammen mit α -Catenin an den intrazellulären Teil von e-Cadherin, das als Transmembranprotein einen Regulator für Zell-Zell-Kontakte darstellt. Zum anderen wandert das β -Catenin in den Nukleus, wo es die Transkription von Zielgenen wie *c-myc* (Apoptose-, Zellwachstumsregulator), *cyclin-D1* (Zellzyklusregulator), matrylin und c-jun aktiviert. Beides zusammen führt zu erhöhter Zellproliferation, verringerter Apoptose und erhöhter Infiltrationskapazität der Zellen.

Aufgrund seiner Rolle hinsichtlich Zelladhäsion und Zellproliferation kann eine unregulierte β -Catenin-Expression ein wichtiger Faktor der frühen Kolonkarzinogenese sein, der durch *APC* beeinflusst wird [Kolligs et al., 2002; Leslie et al., 2002; NCBI, 2003].

1.2.3.2 *KRAS-Gen*

Das *KRAS*-Gen gehört mit *HRAS* und *NRAS* zu der *RAS*-Genfamilie und damit zu jenen Genen, die in menschlichen Tumoren am häufigsten mutiert sind. In der kolorektalen Tumorgenese sind *KRAS*-Mutationen frühe, aber keine initiiierenden Ereignisse und lassen sich mit einer Häufigkeit von etwa 30-50 % in den Adenomen und Karzinomen nachweisen [Scott et al., 1993; Fearon, 1994; Jen et al., 1994; Rashid et al., 1999; Andreyev et al., 2001]. Die Mutationen im *KRAS*-Gen sind vor allem Punktmutationen und betreffen zu etwa 90 % die Kodons 12 und 13 [Bos, 1989; Fearon, 1994].

Das *KRAS*-Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert (12p12.1), kodiert für ein 21 kDa Protein aus 189 Aminosäuren und ist über den RAS-RAF-MEK-ERK-Reaktionsweg in die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren involviert und damit für Zellproliferation und Zelldifferentiation wichtig [Bos, 1989]. Der *RAS*-Signalweg beginnt außerhalb der Zelle, wo epidermale Wachstumsfaktoren (epidermal growth factors, EGF) an EGF-Rezeptoren der Plasmamembran binden. Dadurch wird eine Dimerisierung der Rezeptoren und eine Auto-Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste ausgelöst. Die phosphorylierten Tyrosine fungieren dann als Bindungsstelle für den Grb2-SOS-Komplex (growth factor receptor binding protein-son of sevenless-Komplex), welcher wiederum das RAS-Protein aktiviert, indem er die Phosphorylierung von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) zu Guanosin-5'-triphosphat (GTP) katalysiert. Dies bewirkt eine Aktivierung und Konformationsänderung im KRAS, so dass

zytosolisches Raf-1 (MAPK-Kinase Kinase) gebunden wird und als KRAS-GTP-Raf-1-Komplex aktiviert vorliegt. In einem nächsten Schritt phosphoryliert und aktiviert Raf-1 MEK (MAPK-ERK-Kinase), welche wiederum ERK (extrazellulär regulierte Proteinkinase) aktiviert. Aktivierte ERK hat im Zytosol viele Substrate und kann im Zellkern Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, Grb2 (growth-factor-receptor-binding-protein), SOS (son of sevenless) oder SRF (serum response factor) phosphorylieren. Die phosphorylierten Transkriptionsfaktoren wiederum aktivieren im Zellkern die Genexpression spezifischer Zielgene wie *c-myc*.

Im Normalfall wird die RAS-Aktivität begrenzt durch die Hydrolyse des RAS-GTPs zum inaktiven RAS-GDP mittels eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP). Liegt ein durch Genmutation verändertes *RAS* vor, so können RAS-Proteine entstehen, die ohne gebundenes Nukleotid aktiv sind oder das GTP des aktiven RAS-GTPs kann hydrolysestabil sein und somit aktiv bleiben. Dadurch können unabhängig von äußerer Stimulation ständig Wachstumssignale an den Zellkern übertragen werden [McCormick, 1989; McCormick, 1995; Leslie et al., 2002; Chang et al., 2003].

1.2.3.3 *TP53-Gen*

TP53-Mutationen kommen mit großer Häufigkeit in vielen humanen Tumoren vor und werden als spätes Ereignis der Karzinogenese auch in etwa 40-50 % der kolorektalen Tumore gefunden [Vogelstein et al., 1988; Kaklamani et al., 1993; Scott et al., 1993; Darmon et al., 1994; Rashid et al., 1999]. Das Auftreten der *TP53*-Mutationen am Übergang von spätem Adenom zum Karzinom ist auch der Grund, weswegen die Anwesenheit oder Abwesenheit dieser Mutationen genutzt wird um Tumore als bösartig oder gutartig einzustufen [Fujimori et al., 2001]. Bei den in kolorektalen Tumoren gefundenen Mutationen handelt es sich vor allem um Missense-Mutationen in der DNS-bindenden Domäne, wobei es durch Austausch einer Aminosäure zu G:C → A:T-Transitionen kommt. Etwa 87 % der *TP53*-Mutationen werden in den Exons 5-8 gefunden und hier sind es die Aminosäuren in den Positionen 175, 245, 248, 249, 273 und 282, die besonders häufig mutiert sind (Hot Spots) [Oren und Rotter, 1999; May und May, 1999].

Beim *TP53* handelt es sich um ein Tumorsuppressorgen, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert ist und für ein 53 kDa Phosphoprotein aus 393 Aminosäuren kodiert. Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist das *TP53* von großer Bedeutung, da es beim Auftreten von DNS-Schäden die Zellproliferation blockiert, die DNS-Reparatur stimuliert und, falls die Reparatur ungenügend ist, apoptotischen Zelltod herbeiführt [Lane, 1992; Oren und Rotter, 1999; May und May, 1999; McKay et al., 2000]. Aus diesem Grund wird das *TP53* auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [Lane, 1992].

Die *TP53*-Proteine bilden Tetramere, die nach Bindung an Konsensussequenzen verschiedener Gene deren Transkription aktivieren. Die gebildeten Genprodukte wiederum wirken hemmend auf Zellzyklus (*IGFBP-3*; *P21*) und Zellwachstum (*P21*; *GADD45*) und fördern die Apoptose

(*BAX*). Durch Überexpression von Wildtyp-*TP53* kann aber auch die Expression anderer Gene gehemmt werden. Zu diesen zählen, neben den Onkogenen *JUN* und *FOS* (Zellproliferation und -differenzierung), das *IL-6*-Gen (Zellproliferation und Apoptose) und das *BCL-2*-Gen (Apoptose) [Ko und Prives, 1996]. Da das *TP53*-Genprodukt ein Zellzyklusregulator mit wachstumshemmender Aktivität ist, kommt es nach Allelverlust zu ungehemmtem Tumorwachstum und Metastasierung. Dabei ist die Mutation eines Allels ausreichend um die normale Funktion des *TP53* zu unterbinden, da die Mehrzahl der mutierten *TP53*-Proteine die Funktion des Wildtyp-*TP53* des zweiten Allels hemmt. Generell führt der Verlust von *TP53* auch ohne weitere Exposition gegenüber externen schädigenden Agentien zu einer genomischen Instabilität [Oren und Rotter, 1999; May und May, 1999; Vogelstein et al., 2000; Leslie et al., 2002].

1.2.4 Kolonkarzinogenese: Bottom-up oder Top-down?

Hinsichtlich der Entstehung frühester präneoplastischer Veränderungen im Kolon gibt es zwei unterschiedliche Theorien, die sich vereinfacht als Bottom-up- und Top-down-Modelle bezeichnen lassen. Die Arbeitsgruppen um Wright und Potten gehen davon aus, dass das erste Mutationsereignis in einer Stammzelle der Kolonkrypten oder einer sehr frühen teilungsaktiven Tochterzelle stattfinden muss [Bach et al., 2000; Wright und Poulsom, 2002; Preston et al., 2003]. Aufgrund der Kryptmikroarchitektur soll diese Mutation über das Blut und nicht über Inhaltsstoffe des Darmlumens vermittelt sein. Nach diesem ersten Mutationsereignis ist eine zweite Mutation in der sich vermehrenden Zellpopulation wahrscheinlicher. Bei diesem Modell müssen die teilungsaktiven Zellen erst als aberrante Kryptfoki, Mikroadenome oder adenomatöse Polypen in das Kolonlumen hineinwachsen, bevor die Fäzesinhaltsstoffe eine Rolle bei der Kolonkarzinogenese spielen können. Kinzler und Vogelstein hingegen gehen von einem Top-down-Modell aus, bei dem eine luminal gelegene Kolonzelle geschädigt wird und sich unter Verdrängung der normalen Zellen zur Kryptbasis hin monoklonal ausbreitet [Shih et al., 2001]. Bei diesem Modell soll auch das erste, initiiierende Mutationsereignis über mutagene Inhaltsstoffe des Darmlumens vermittelt sein.

Unabhängig vom Ort der ersten Mutation sind sich die Autoren einig, dass eine Mutation des *APC*-Gens als erste Schädigung ausreicht, um zu veränderter Zelladhäsion, -migration und -replikation zu führen. Veränderungen, die schließlich zur Ausbildung von aberranten Kryptfoki, Mikroadenomen und adenomatösen Polypen führen, welche in das Darmlumen und in den Fäzesstrom hineinwachsen können [Nathke et al., 1996; Polakis, 1997]. Dort sind die Zellen dann den zytotoxischen und genotoxischen Fäzesinhaltsstoffen ausgesetzt und unterliegen nachfolgenden Mutationen. Dementsprechend stellen aberrante Kryptfoki, Mikroadenome und adenomatöse Polypen wichtige präinvasive Veränderungen der humanen Kolonmukosa dar.

1.3 Kolongewebe, Kolonkrypten und Kolonzellen

1.3.1 Kolongewebe und Kolonkrypten

Der gesamte Verdauungstrakt des Menschen ist von einem einfachen kolumnaren Epithel ausgekleidet, das ständig erneuert wird. Zellverlust und Zellerneuerung befinden sich dabei in einem dynamischen Gleichgewicht [Shanmugathan und Jothy, 2000]. Die Mikroarchitektur des Dickdarms wird durch Kolonkrypten charakterisiert, die etwa 50 Zellen tief sind und dazu dienen, die Kolonstammzellen an der Kryptbasis vor der sehr mutagenen Umgebung des Kolonlumens zu schützen (Abbildung 5). So garantieren sowohl die Struktur der Kolonkrypten als auch die Dynamik der Zellreplikation, dass unter normalen Umständen die Kolonstammzellen und die sich noch replizierenden Tochterzellen im unteren Drittel der Krypten gelegen sind. Diese Anordnung der sich replizierenden Zellen sowie der aus der Teilung resultierende Auswärts-aufwärts-Druck, wie auch die Mukusexkretion sorgen dafür, dass die Stammzellen nicht mit den Inhaltsstoffen des Kolonlumens in Kontakt kommen [Potter, 1999].

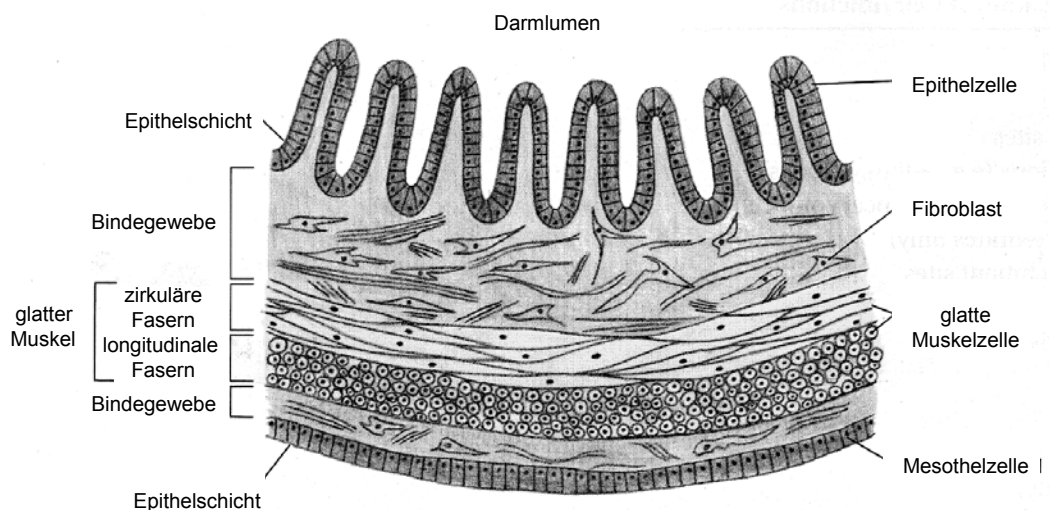


Abbildung 5: Querschnitt durch das Darmlumen nach Alberts et al. [1994].

1.3.2 Kolonkrypten und Stammzellen

Die ständig in das Darmlumen abgeschilferten Zellen werden von der Kryptbasis her ersetzt, wo sich die intestinalen Stammzellen befinden. Bei diesen handelt es sich um relativ undifferenzierte Zellen, die zur Proliferation, zur Selbsterhaltung und zur Geweberegeneration fähig sind [Potten und Loeffler, 1990]. Die Teilung der Kolonstammzellen erfolgt unter normalen Bedingungen asymmetrisch und bringt je eine Stammzelle und eine Tochterzelle hervor, wodurch die Stammzellpopulation stabil gehalten wird. Die Tochterzellen teilen sich weitere vier bis sechs Mal und differenzieren sich aus, während sie in Richtung Darmlumen zur Mukosaoberfläche wandern. Dort unterliegen sie normalerweise dem programmierten Zelltod und werden ins Darmlumen abgeschilfert. Hierdurch haben Mutationen in den ausdifferenzierten Zellen im

Normalfall keinen Einfluss auf die Integrität der Kryptzellpopulation [Potter, 1999; Bach et al., 2000].

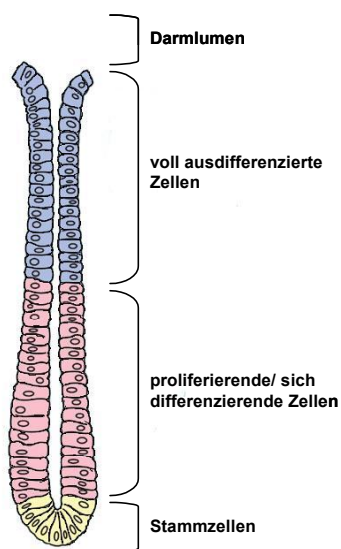


Abbildung 6: Querschnitt durch eine Kolonkrypte mit Stammzellen, Proliferationszone und ausdifferenzierten Zellen.

Die humanen Kolonkrypten lassen sich, von der Kryptbasis beginnend, in drei Abschnitte gliedern. Sie bestehen aus klonogenen Stammzellen, teilungsaktiven, aber nicht mehr klonogenen Zellen und aus nicht mehr teilungsaktiven, ausdifferenzierten Zellen (Abbildung 6). Die exakte Anzahl der klonogenen Stammzellen ist nicht bekannt, wurde jedoch anhand von Geweberegenerationsstudien und Zellzykluszeiten geschätzt [Potten, 1986; Potten und Loeffler, 1990]. Demnach sind etwa 34-36 Zellen der Kryptbasis klonogen, während der darüber liegende Bereich aus etwa 114 sehr schnell proliferierenden Zellen kein Stammzellpotential mehr hat. Alle übrigen Zellen einer Krypte sind ausdifferenzierte, nicht mehr teilungsfähige Zellen [Bach et al., 2000]. Die Stammzellhomöostase ist insofern von Interesse, als dass eben dieser Mechanismus im Fall der

Kanzerogenese außer Kontrolle geraten ist. Die Erforschung der Kolonstammzellen kann folglich helfen, das unkontrollierte Zellwachstum bei der Krebsentstehung zu verstehen und eventuell zu kontrollieren [Karam, 1999; Kim und Shibata, 2002].

1.3.3 Kolorektale Primärzellen und Kolonzelllinien

Humane Kolonzellen sind als *in vitro* Modelle der kolorektalen Karzinogenese und für die Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unverzichtbar [Marian, 2002]. Dabei besteht die Möglichkeit zum einen mit primären, aus humanem Kolongewebe isolierten Zellen zu arbeiten [Schorkhuber et al., 1998; Booth et al., 1999; Pedersen et al., 2000a; Pedersen et al., 2000b; Schaeferhenrich et al., 2003a], zum anderen Kolonzelllinien zu verwenden. Die Aufarbeitung von humanem Kolongewebe und die Gewinnung von primären Kolonepithelzellen haben den Vorteil mit unveränderten Epithelzellen arbeiten zu können, die einen stabilen Karyotyp aufweisen. Nachteilig sind dabei die begrenzte Verfügbarkeit des Gewebes und eine schlechte zeitliche Planbarkeit der Versuche. Kurzzeitige Kulturen von primären Kolonzellen sind in der Literatur immer wieder beschrieben worden, doch reicht die Kultivierbarkeit der Zellen selten über 10-14 Tage hinaus [Marian, 2002].

Aufgrund dieser Schwierigkeiten wird in vielen Fällen mit Kolonkarzinomzelllinien gearbeitet (CaCo2 [Fogh et al., 1977]; HT29 [Fogh und Trempe, 1975]; HT29clone19a [Augeron und Laboisie, 1984]), welche sich gut kultivieren lassen und eine zeitlich exakte Versuchsplanung ermöglichen. Hier ist der Nachteil, dass es sich um Zellen aus dem Spätstadium der

Kolonkarzinogenese handelt, die meistens einen polyploiden Chromosomensatz mit instabilem Karyotyp aufweisen (CaCo2: Melcher et al., 2002; HT29: Kawai et al., 2002; HT29clone19a: Kuechler et al., 2003).

Um mit primärähnlichen Zellkulturen arbeiten zu können, wurden unterschiedliche Wege beschritten, so die Immortalisierung gesunder Kolonzellen, wobei diese immortalisierten Zelllinien keine weite Verbreitung fanden [Sahi et al., 1998; Duthie et al., 2000]. Zudem wurden Karzinomzelllinien rückdifferenziert [Augeron und Labois, 1984] oder Zelllinien von kolorektalen Adenomen etabliert [Richter et al., 2002; Menzel et al., 2004]. Während die rückdifferenzierten Kolonkarzinomzelllinien den instabilen Karyotyp der Stammzellen besitzen [Kuechler et al., 2003], ist der Karyotyp der aus frühen Kolonadenomen gewonnenen Zellen meist nur gering verändert und relativ stabil [Schaeferhenrich et al., 2003b].

Um zu einem umfassenden Bild über die molekularen Vorgänge der humanen Kolonkarzinogenese zu gelangen sollten für die Untersuchungen unterschiedliche Zelltypen verwendet werden, die die aufeinanderfolgenden Stadien der Tumorentstehung widerspiegeln.

1.4 Induktion, Reparatur und Erfassung von DNS-Schäden

1.4.1 Induktion von DNS-Schäden

Das multifaktorielle Geschehen der Krebsentstehung lässt sich auf eine Vielzahl von exogenen und endogenen Ursachen zurückführen. Die exogenen Einflüsse lassen sich dabei unterteilen in physikalische (radioaktive Strahlung, Röntgenstrahlung, UV-Strahlung), chemische (Schwermetalle, Asbest, Alkylantien, Nitrosamine, polyaromatische Kohlenwasserstoffe) und biologische (Papillomaviren, Hepatitis-B-Viren) Faktoren. Zu den endogenen Einflüssen zählen alle reaktiven Metabolite, die im Rahmen des normalen Stoffwechselgeschehens im menschlichen Organismus gebildet werden. Dies können unter anderem reaktive Sauerstoffspezies, reaktive Stickstoffspezies, Lipidperoxydationsprodukte und alkylierend oder halogenierend wirkende Substanzen sein [Burcham, 1999].

Auch ernährungsbedingte Risikofaktoren lassen sich in exogene, mit der Nahrung aufgenommene und endogene, aufgrund einer bestimmten Ernährung im Organismus gebildete Faktoren unterteilen. Beide können in den Zielzellen und Zielgenen der kolorektalen Karzinogenese zytotoxisch, genotoxisch oder proliferationsfördernd wirken und so auf molekularer Ebene die Tumorentstehung auslösen bzw. bei bereits vorhandenen präneoplastischen Veränderungen die maligne Entartung beschleunigen [Berlau et al., 2004]. Im Rahmen dieser Arbeit interessieren vor allem reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species; ROS) und reaktive α,β -ungesättigte Aldehyde, die aufgrund einer unausgewogenen Ernährung, durch oxidativen Stress und nachfolgende Lipidperoxydation endogen gebildet werden können [Burcham, 1999; Marnett und Plastaras, 2001; Bartsch et al., 2002].

1.4.1.1 Oxidativer Stress

Als Quelle für reaktive Sauerstoffspezies kann in den meisten Geweben die mitochondriale Freisetzung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) angenommen werden, wobei peroxisomale und mikrosomale Oxidasen ebenfalls zur endogenen Freisetzung von ROS beitragen [Nestmann et al., 1996]. Diese reaktiven Sauerstoffspezies werden im menschlichen Organismus durch ausgeklügelte Schutzmechanismen inaktiviert, zu denen Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase gehören [Mates et al, 1999; Irshad und Chaudhuri, 2002]. Aber auch zahlreiche nichtenzymatische Antioxidantien wie die Vitamine A, E und C, Selen, GSH, Ubiquinon sowie Flavonoide/ Polyphenole zählen zu den schützenden Substanzen [Jakob und Burri, 1996; Irshad und Chaudhuri, 2002].

Individuelle Lebensgewohnheiten, wie z. B. eine unausgewogene Ernährung, können zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien führen, was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Dieser hat im Organismus weitreichende Auswirkungen, da er zur Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren führt und so an der Entstehung verschiedener chronischer Krankheiten beteiligt ist. Hierzu zählen neben beschleunigten Alterungsprozessen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen vor allem auch Krebserkrankungen [Jakob und Burri, 1996; Irshad und Chaudhuri, 2002]. Die Erkenntnis, dass oxidationsinduzierte prämutagene Schäden zur Mutagenese und Kanzerogenese beitragen, wird durch Bestimmung der ROS-induzierten DNS-Basisschadensrate und der mutagenen Eigenschaften verschiedener oxidierten DNS-Basen gestützt. Auch gibt es epidemiologische Hinweise, dass eine antioxidantienreiche Ernährung antikarzinogen wirkt [Wagner et al., 1994; Lof und Poulsen, 2000].

Wasserstoffperoxid

H_2O_2 wurde bereits in verschiedenen Studien und auch in dieser Arbeit als Modellschadstoff für ROS zur Induktion von DNS-Schäden eingesetzt [Glei et al., 2002; Schaeferhenrich et al., 2003b]. Im menschlichen Organismus kann H_2O_2 direkt als Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen oder indirekt durch spontane bzw. enzymkatalysierte Dismutation von $\text{O}_2^{\cdot -}$ entstehen und spielt als latente Form von Hydroxylradikalen eine wichtige Rolle bei der Entstehung

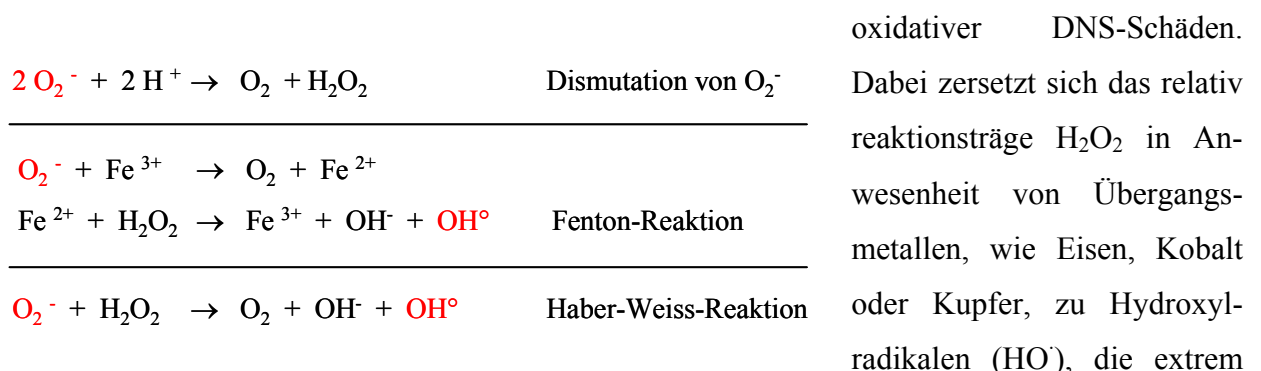


Abbildung 7: Entstehung von Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen nach Marquart und Schäfer [2004].

abreagieren. Da Eisen und Kupfer als Bestandteile des Nukleoproteinkomplexes des Chromatins wichtig für die Bindung der DNS an die Kernmatrix sind, werden Hydroxylradikale auch sehr dicht am DNS-Molekül gebildet und reagieren mit diesem [Lewis und Laemmli, 1982; Cadet et al., 1999]. Diese übergangsmetallkatalysierte Fenton-Reaktion ist neben der Dismutation von $O_2^{\cdot -}$ und der Haber-Weiss-Reaktion in Abbildung 7 dargestellt [Marquart und Schäfer, 2004].

Interaktionen der ROS mit der DNS

Reaktive Sauerstoffspezies reagieren mit der DNS unter Bildung oxidiert Basen und leisten so über die Induktion oxidativer Schäden einen wesentlichen Beitrag zur DNS-Basisschadensrate. So schätzen Helbock et al. [1998], dass im menschlichen Organismus pro Zelle und Tag etwa 11.500 oxidierte Basen gebildet werden. Der Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf die DNS führt zu über 20 verschiedenen Reaktionsprodukten, von denen jedes zur Mutagenese beitragen kann. Dabei wurden nach Schädigung mit ROS besonders häufig Mutationen von GC-Basenpaaren nachgewiesen, was zu der Vermutung Anlass gab, dass oxidative Schäden an dG oder dC besonders wichtig sind [McBride et al., 1991]. So geht aus der dG-Oxidation das 8-Oxo-2'-desoxy-Guanosin (8-Oxo-dG) als Hauptprodukt hervor, das schwach prämutagen wirkt und G:C → T:A-Transversionen induziert [Wood et al., 1990; Hussain und Harris, 1998]. Eine andere häufige Schädigung ist die Oxidation des dC mit nachfolgender G:C → A:T-Transition [Tkeshelashvili et al., 1991]. Ferner sind zwei durch oxidative Deaminierung von dC entstandene Produkte, 5-Hydroxyuracil und Uracilglycol, hoch mutagen und lösen C:G → T:A-Transitionen aus [Kreutzer und Essigmann, 1998].

Nach DNS-Oxidation wurden auch modifizierte AT-Basenpaare gefunden, wobei bei diesen die mutagenen Folgen nicht so ausgeprägt zu sein scheinen wie bei den GC-Basenpaaren. So ist das durch Thymin-Oxidation entstehende Hauptprodukt Thyminglykol nur schwach mutagen [Basu et al., 1989]; das gleiche gilt für ein weiteres Reaktionsprodukt, das 2-(Hydroxymethyl)-2'-deoxyuridin [Chaung und Boorstein, 1997; Burcham, 1999; Marnett und Plastaras, 2001]. In Summe betrachtet sind oxidierte DNS-Basen prämutagen und verursachen, wenn sie nicht repariert werden, Mutationen, die häufig in geschädigten menschlichen Genen wie Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gefunden werden [Burcham, 1999].

1.4.1.2 Lipidperoxidation

Die durch oxidativen Stress im Überschuss vorliegenden reaktiven Sauerstoffspezies reagieren nicht nur mit der DNS, sondern mit allen zellulären Makromolekülen, so auch mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der extrem oxidationsempfindlichen Phospholipide der Zellmembran [Marnett, 2000]. Der Angriff der reaktiven Sauerstoffspezies verursacht dabei eine Zersetzung der Membranlipide, die als Lipidperoxidation bezeichnet wird. Der Hauptreaktionsweg dieser Lipidperoxidation ist eine β -Spaltung der Fettsäuremoleküle, gefolgt von einer Radikalkettenreaktion, wobei ein einziges durch ROS ausgelöstes Oxidationsereignis etwa 60

Moleküle Linolsäure bzw. 200 Moleküle Arachidonsäure verbrauchen kann (Abbildung 8) [Pryor, 1986; Marnett, 2000].

Neben der β -Spaltung gibt es weitere Reaktionswege der Lipidperoxidation, welche mit der Vielzahl mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den Biomembranen und sekundären Reaktionsprodukten zu einem komplexen Gemisch reaktiver Metabolite führen. Bei einem Großteil dieser Produkte handelt es sich um flüchtige Aldehyde, die sowohl gesättigt als auch ungesättigt sein können [Esterbauer, 1982; Esterbauer et al., 1991]. Das quantitative Hauptprodukt der Lipidperoxidation ist Malondialdehyd (MDA), während trans-2-Alkenale und 4-Hydroxy-2-alkenale in geringeren Mengen gebildet werden. Letztere weisen allerdings bei physiologischem pH-Wert eine höhere Elektrophilie und Reaktivität auf als MDA [Toyokuni et al., 1997; Burcham, 1999].

Um eine Oxidation der Lipidmembranen zu verhindern existieren im menschlichen Organismus Schutzsysteme, die entweder aus antioxidativ wirkenden Molekülen (Vitamin A, C und E) oder Enzymsystemen (Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase) bestehen [Marnett, 2000]. So wird *in vivo* die Länge der Radikalkettenreaktion z. B. durch die Vitamin E-Konzentration in der Lipiddoppelmembran bestimmt, da dieses Vitamin die Peroxylradikale

reduziert und dadurch die Kettenreaktion unterbricht [Waldeck und Stocker, 1996]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch ROS ausgelöste Schädigung der Zellmembran eine Vielzahl reaktiver Metabolite freisetzt und dadurch enorme Auswirkungen auf die Integrität der DNS hat [Schuler et al., 1997; Ames und Gold, 1998]. Mit trans-2-Hexenal (Hexenal) und 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) soll im Folgenden auf zwei dieser Lipidperoxidationsprodukte näher eingegangen werden.

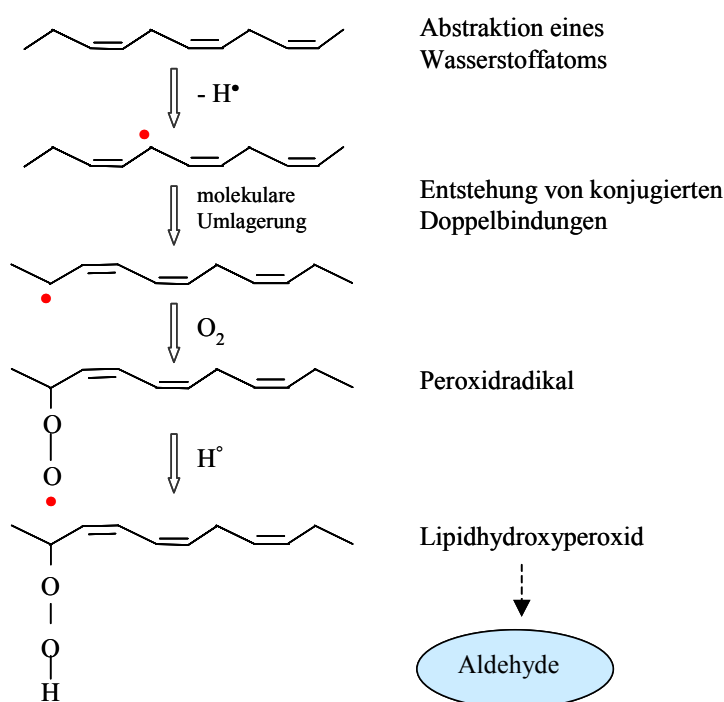


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Lipidperoxidation nach Santanam et al. [1998].

Trans-2-Hexenal und 4-Hydroxy-2-nonenal

Hexenal und HNE sind reaktive α,β -ungesättigte Aldehyde, die sowohl lipophile (Kohlenstoffkette) als auch lipophobe (Carbonylgruppe) Eigenschaften aufweisen (Abbildung 9).

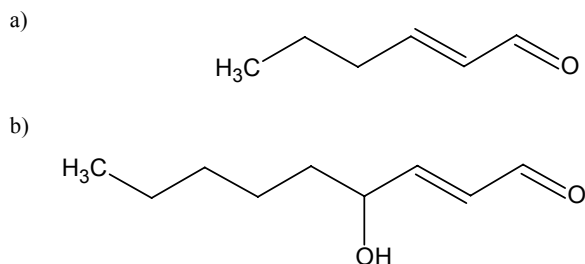


Abbildung 9: Strukturformeln von a) trans-2-Hexenal und b) 4-Hydroxy-2-nonenal.

Betrachtet man die funktionellen Gruppen dieser Substanzen, so besitzen beide eine C-C-Doppelbindung und eine Carbonylgruppe, das HNE zusätzlich eine Hydroxylgruppe am C4. Aufgrund des Systems konjugierter C-C-Doppelbindungen trägt das C3 beider Substanzen eine positive Partialladung, die beim HNE durch den induktiven Effekt der

Hydroxylgruppe zusätzlich verstärkt wird. Wegen der positiven Partialladung ist das C3 Zielatom der kovalenten Adduktbildung mit zellulären Nukleophilen [Eckl et al., 1993].

Die charakteristische Reaktion der α,β -ungesättigten Aldehyde ist die Michael-Addition, bei der die Aldehyde als Michael-Akzeptoren mit zellulären Nukleophilen, wie Thiolen, Imidazolen oder Aminen, reagieren. Auch die Entgiftung der zytotoxischen und genotoxischen 2-Alkenale und 4-Hydroxyalkenale stellt eine Michael-Addition dar und geschieht über GST-vermittelte GSH-Konjugation [van Iersel et al., 1997]. In diesem Zusammenhang führt eine GSH-Depletion zu erhöhten Konzentrationen an reaktiven Lipidperoxidationsprodukten und damit zu einer erhöhten DNS-Basisschadensrate [Ebert et al., 2001; Glaab et al., 2001].

Interaktionen der Lipidperoxidationsprodukte mit der DNS

Sowohl die aldehydischen Lipidperoxidationsprodukte als auch die in Anwesenheit von H_2O_2 aus den α,β -ungesättigten Aldehyden entstehenden Epoxide reagieren mit der DNS unter Bildung exozyklischer DNS-Addukte [Chung et al., 1996]. Die meisten dieser exozyklischen DNS-Addukte blockieren die Watson-Crick-Basenpaarung und wirken auf diese Weise promutagen [Marnett und Plataras, 2001]. 2-Alkenale und 4-Hydroxy-2-alkenale bilden durch elektrophile Addition an die DNS Propano-DNS-Addukte, während die oft noch reaktiveren Epoxide zu Etheno-DNS-Addukten führen [Chung et al., 1996; Toyokuni et al., 1997; Burcham, 1999]. Sowohl bei den Propano- als auch bei den Etheno-Addukten reflektiert die C7-Seitenkette des neugebildeten Imidazolrings das Aldehyd, welches das Addukt gebildet hat [Chen und Chung, 1996]. Aus den Lipidperoxidationsprodukten Hexenal und HNE bzw. ihren Epoxiden 2,3-Epoxyhexenal und 2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal, würden dementsprechend DNS-Addukte mit Propyl- und Hydroxyhexylseitenkette entstehen [Chung et al., 1996].

1.4.2 Reparatur von DNS-Schäden

Die DNS-Reparatur ist ein biologisch sehr bedeutsamer Vorgang, der dafür sorgt, dass die im Organismus ständig auftretenden DNS-Schädigungen erkannt und repariert werden. Auf diese

Weise wird eine Anhäufung der Schäden verhindert, die zu einer veränderten Gentranskription, zu einer gestörten DNS-Replikation und zu manifesten Mutationen führen würde. Die Verschiedenartigkeit der durch genotoxische Substanzen induzierten DNS-Schäden erfordert entsprechend unterschiedliche Reparatursysteme, die in komplexer Weise zusammenwirken. Auch wenn bestimmte Arten von DNS-Schäden bevorzugt über spezifische Reparaturmechanismen eliminiert werden, gibt es stets auch alternative Reparaturwege [Hennig, 2002; Seyffert, 2003].

Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Reparaturmechanismen sollen im Folgenden kurz dargestellt werden. Dabei sind für die H₂O₂-induzierten Basenläsionen und Einzelstrangbrüche v.a. die nichthomologe-End-zu-End-Verknüpfung (non homologous end joining; NHEJ) und die Basenexzisionsreparatur (BER) relevant, während die ebenfalls induzierten Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination bzw. NHEJ beseitigt werden [Ward et al., 1987; Ward, 1988; Slupphaug et al., 2003]. Die durch die Produkte der Lipidperoxidation induzierten DNS-Schäden werden durch BER, Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und MMR behoben, und zwar werden die exozyklischen Propano-DNS-Addukte durch NER und MMR [Marnett, 2000; Gros et al., 2003] und die exozyklischen Etheno-DNS-Addukte durch BER und NER beseitigt [Marnett, 2000; Chung et al., 2003].

Basenexzisionsreparatur

Kleine chemische Veränderungen der DNS-Basen, die vielleicht nicht die Transkription oder Replikation stören würden, aber häufig zu Basenfehlpaarungen führen, werden bevorzugt durch die BER erkannt und repariert. An dem mehrstufigen Prozess der BER sind unterschiedliche DNS-Glykosylasen beteiligt, die die N-glykosidische Bindung zwischen der geschädigten Base und der Desoxyribose hydrolysieren. Nach dem Ausschneiden der Base schneidet eine AP-Endonuklease die zugehörige Zucker-Phosphatbindung. Der entstehende 5'-Desoxyribose-Phosphatrest wird durch die Lyase-Aktivität der DNS-Polymerase- β abgespalten. Die verbleibende Lücke wird durch die Polymeraseaktivität der DNS-Polymerase- β aufgefüllt und durch die DNS-Ligase geschlossen. Auch DNS-Einzelstrangbrüche können über BER repariert werden, wobei etwa 2-10 Basen ausgeschnitten werden. Hierbei scheinen die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, die an Einzelstrangbrüche bindet, und die Polynukleotidkinase eine wichtige Rolle zu spielen, indem sie die freien Enden schützen und modifizieren [Yu et al., 1999; Hennig, 2002; Seyffert, 2003].

Nukleotidexzisionsreparatur

Die NER erkennt und repariert eine Vielzahl von Schäden, die die Basenpaarung stören und daher den normalen Verlauf von Transkription und Replikation behindern. In einem ersten Schritt wird der DNS-Schaden durch den XPA-RPA-Komplex erkannt. Dieser Proteinkomplex sucht in der DNS nach Fehlern oder wird an Stellen angelagert, an denen die RNA-Polymerase

durch einen Schaden blockiert wird. Durch zwei Endonukleasen (XPG und ERCC1/XPF) wird der geschädigte Strang dann zunächst an der 3'-Seite und danach an der 5'-Seite geschnitten, wodurch ein Oligonukleotid von 24-32 Basen entfernt wird. Die entstandene Einzelstrangregion wird in der DNS-Reparatursynthese durch Polymerase 1 aufgefüllt. Abschließend wird durch Ligasen die kovalente Bindung der neusynthetisierten Nukleotide mit dem DNS-Strang wieder hergestellt [Yu et al., 1999; Hennig, 2002; Seyffert, 2003].

Basenfehlpaarungsreparatur

Die MMR erkennt und repariert Basenfehlpaarungen, die, sofern sie nicht ordentlich repariert werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Mutationen führen. Darüber hinaus werden durch MMR auch kleine Insertions-Deletions-Fehlpaarungen von bis zu acht Nukleotiden und durch Noxen induzierte DNS-Veränderungen erkannt und repariert. Der erste Schritt der Reparatur, die Erkennung und Bindung der Schädigung, erfolgt durch den hMutS α - bzw. hMutS β -Komplex. Während hMutS α aus hMSH2 und hMSH6 besteht und hauptsächlich Fehlpaarungen und einzelne ungepaarte Basen erkennt, ist MutS β ein Heterodimer aus hMSH2 und hMSH3, der Insertions-Deletions-Fehlpaarungen erkennt. Im nächsten Schritt kommt es zur Assoziation eines weiteren, als MutL α bezeichneten Heterodimers und schließlich zum Ausschneiden des vorliegenden Schadens. An der Exzision des DNS-Stranges und der nachfolgenden Neusynthese sind eine Reihe verschiedener Proteine beteiligt, wobei der genaue Ablauf noch nicht vollständig aufgeklärt ist [Yu et al., 1999; Hennig, 2002; Seyffert, 2003].

Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Die Reparaturmechanismen, die zur Beseitigung von Doppelstrangbrüchen führen, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: homologe Rekombination und NHEJ. Homologe Rekombination findet vor allem vor und nach der DNS-Replikation in der S-Phase statt, wobei die DNS-Neusynthese anhand der identischen Sequenz in der Schwesterchromatide geschieht. Im Gegensatz dazu läuft die NHEJ vorwiegend in der G1- und zu Beginn der S-Phase ab. Hier werden die Doppelstrangbrüche ohne weitere Matrize durch Verknüpfung der freien Enden repariert [Yu et al., 1999; Hennig, 2002; Seyffert, 2003].

1.4.3 Ernährung, oxidativer Stress, Lipidperoxidation und genspezifische DNS-Schäden

Faktoren der Ernährung und des individuellen Lebensstils spielen eine wichtige Rolle bei der humanen Kolonkarzinogenese. Dabei kann man sich dem kausalen Zusammenhang zwischen Ernährung, endogen gebildeten genotoxischen Metaboliten, spezifischen DNS-Schäden und Mutationen in den relevanten Genen sowie der Tumorbildung auf unterschiedlichen Ebenen nähern.

Auf epidemiologischer Ebene ist hinsichtlich der kolorektalen Krebsentstehung bekannt, dass bestimmte Faktoren der Ernährung und des individuellen Lebensstils zu oxidativem Stress im Organismus führen. Damit verbunden ist eine verstärkte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies

und eine nachfolgende Lipidperoxidation. Die Frage, ob oxidative DNS-Schäden einen Biomarker für ernährungsbedingte Kolonkarzinogenese darstellen, wurde von Halliwell [2002] anhand der aktuellen Literatur eingehend diskutiert und positiv beantwortet. Der Autor kommt unter anderem zu dem Schluss, dass eine obst- und gemüsereiche Ernährung vor ROS-induzierten oxidativen DNS-Schäden und nachfolgender Tumorentwicklung schützen kann. Collins und Harrington [2003] untersuchten speziell den Zusammenhang zwischen Ernährung, antioxidativer Kapazität des Blutplasmas und der Lymphozyten, DNS-Reparatur sowie oxidativen DNS-Schäden. Dabei fanden die Autoren in einer Cross-Over-Studie, dass der Verzehr von Kiwifrüchten sowohl die antioxidative Kapazität von Plasma und Lymphozyten als auch die spezifische DNS-Reparatur nach oxidativen Schäden signifikant erhöht. Zudem fanden sie eine verringerte Basalkonzentration oxidierteter Purin- und Pyrimidinbasen.

Von der Vielzahl an Studien, die den Einfluss einzelner Ernährungsfaktoren auf Marker für oxidativen Stress bzw. Lipidperoxidation untersucht haben, sollen hier exemplarisch die Arbeiten von Kiokias und Gordon [2003], Wacker et al. [2002] und Bartsch et al. [2002] erwähnt werden. So wurde von Kiokias und Gordon [2003] in einer Interventionsstudie mit natürlichen Carotinoiden eine inverse Korrelation zwischen den verabreichten Carotinoiden und der 8-OH-dG Konzentrationen im Urin gefunden. Von Bartsch et al. [2002] wurde der Einfluss der Ernährung auf die exozyklischen DNS-Addukte als Marker von ROS-induzierter Lipidperoxidation für Etheno-dG-Addukte untersucht und von Wacker et al. [2002] die Modulierbarkeit von Propano-dG-Addukten im humanen Kolon durch resistente Stärke nachgewiesen. Für MDA, das Hauptprodukt der Lipidperoxidation, wurden die DNS-Addukte im menschlichen Kolon von Leuratti et al. [2002] bestimmt, wobei die Autoren eine inverse Korrelation zwischen Obst, Gemüse und Vollkornbrot in der Nahrung und den gemessenen MDA-dG-Adduktmengen im untersuchten Gewebe fanden. Ferner ist auf epidemiologischer Ebene bekannt, dass in Plasma und Kolongewebe von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen bzw. Kolontumoren erhöhte Mengen an oxidierten Basen, Lipidperoxidationsprodukten und exozyklischen DNS-Addukten gefunden werden. So wurde eine signifikant höhere Konzentration an 8-OH-dG-Addukten in Lymphozyten von Patienten gefunden, die an Ulcerativer Colitis bzw. Morbus Crohn leiden [D'Odorico et al., 2001] und ebenso in Lymphozyten von Darmkrebspatienten [Gackowski et al., 2002]. Generell wurde in Tumorgewebe, im Vergleich zu gesundem Gewebe desselben Organismus, eine erhöhte Anzahl an oxidierten Basen festgestellt [Malins und Haimanot, 1991].

Entsprechend zu den Markern für oxidativen Stress wurden erhöhte MDA - und HNE-Konzentrationen im Kolongewebe von Darmkrebspatienten gefunden [Skrzydowska et al., 2001]. Im Zusammenhang mit den erhöhten Mengen an Lipidperoxidationsprodukten konnten Skrzydowska et al. eine gleichzeitig verringerte Konzentration nichtenzymatischer

Antioxidantien und eine verringerte Katalaseaktivität nachweisen, während die Konzentrationen von Superoxiddismutase, GST-Peroxidase und GST-Reduktase erhöht waren. Auch die durch Reaktion der Lipidperoxydationsprodukte mit der DNS gebildeten Addukte liegen in Kolongewebe von Patienten mit Ulcerativer Colitis bzw. Morbus Crohn erhöht vor, was Bartsch und Nair [2002] für die promutagenen Etheno-Addukte nachweisen konnten und Kruidenier et al. [2003] für MDA-DNS-Addukte.

Hinsichtlich genspezifischer Schäden fanden Hussain et al. in entzündetem Kolongewebe von Patienten mit Ulcerativer Colitis verglichen mit normalem Kolongewebe derselben Patienten eine höhere Rate an *TP53*-Mutationen. Hier sind die vermehrten Mutationen wahrscheinlich Resultat des durch die Entzündung hervorgerufenen oxidativen Stress, könnten aber auch Folge einer den vermehrten Zelltod kompensierenden erhöhten Zellteilungsrate sein [Hussain et al., 2000a]. Entsprechende Ergebnisse wurden für *KRAS*-Mutationen in Pankreatitispatienten wie auch für *TP53*-Mutationen von Patienten, die an Wilsons Disease bzw. Hämochromatose leiden, publiziert [Hussain et al., 2000b].

Der direkte Zusammenhang zwischen einzelnen Ernährungsfaktoren und genspezifischen Schäden in den für die kolorektale Karzinogenese relevanten Genen (*APC*, *KRAS* und *TP53*) wurde ebenfalls auf epidemiologischer Ebene untersucht. So konnten Slattery et al. [2000] diesen durch Untersuchung und Sequenzierung von unverändertem Kolongewebe sowie von Tumormaterial mit und ohne *KRAS*-Mutationen, für Veränderungen im *KRAS* nachweisen. Für das generelle Auftreten von *KRAS*-Mutationen wurde ein inverser Zusammenhang mit dem Anteil an Kohlgemüse in der Nahrung gefunden. Darüber hinaus konnten die häufigsten der auftretenden *KRAS*-Mutationen mit spezifischen Ernährungsfaktoren assoziiert werden. So wurden z. B. G:C → A:T-Transitionen in der 2. Base von Kodon 12 mit Faktoren in Zusammenhang gebracht, die die DNS-Methylierung beeinflussen (Folat, Vitamin B6 bzw. Vitamin B12). G:C → A:T-Transitionen in der 2. Base von Kodon 13 waren über den ernährungsbedingten Insulinspiegel mit der Aufnahme von Kohlenhydraten und Weißmehlprodukten sowie dem glykämischen Index verknüpft. Ferner waren spezifische G → T Mutationen in der 2. Base von Kodon 12 des *KRAS*-Gens mit der Gesamtfettaufnahme und dem Anteil an gesättigten bzw. einfach ungesättigten Fettsäuren in der Nahrung verbunden.

Ernährungsassoziierte *TP53*-Mutationen in den Exons 5-8 wurden analog zu den *KRAS*-Mutationen ebenfalls von Slattery et al. [2002] untersucht. Für generelle Veränderungen im *TP53* fanden die Autoren einen signifikant positiven Zusammenhang mit dem Verzehr einer „Western Style Diet“. Einzelne Ernährungsfaktoren waren wiederum mit häufig vorkommenden, spezifischen Mutationen verknüpft. So fanden die Autoren einen Zusammenhang zwischen hohem glykämischen Index und Transitionen bzw. Missense Mutationen im *TP53*. Ein hoher

Anteil an rotem Fleisch, Fast-Food und trans-Fettsäuren in der Ernährung war signifikant mit Transitionen, Transversionen, Missense und CpG-Mutationen assoziiert. Schließlich waren Veränderungen in der L2-Schleife des *TP53* und im Arg²⁷³-HotSpot signifikant positiv mit dem glykämischen Index assoziiert.

Auf molekularer Ebene beinhaltet der Prozess der genspezifischen Mutagenese die Schädigung der DNS, Reparaturprozesse, ein Nicht-Erkennen der DNS-Schädigung, die Fixierung der Mutation und schließlich die Selektion der veränderten Zelle. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Prozess abläuft, variiert innerhalb eines Gens von Base zu Base und hängt zudem von dem jeweiligen sequenziellen Kontext ab. Als Ergebnis dieses Prozesses ergibt sich ein durch ein bestimmtes Mutagen induziertes Mutationsspektrum entlang der DNS-Sequenz des jeweiligen Gens. Dieses sollte, sieht man von der Zellselektion ab, theoretisch dem in Tumordatenbanken zu einem Mutationsspektrum zusammengetragenen Daten entsprechen. Eine Untersuchung dieses Zusammenhangs ist möglich durch Behandlung von Zellen mit mutagen wirkenden Noxen und anschließender quantitativer Erfassung der auftretenden Veränderungen bzw. spezifischen Reparaturraten. Schließlich sollte sich bestimmen lassen, ob die nachgewiesenen Ergebnisse das tumorspezifische Mutationsspektrum des jeweiligen Gens reflektieren [Pfeifer, 2000].

Für HNE-spezifische Schäden im *TP53*-Gen wurde dieser Zusammenhang von Hu et al. [2002b] in einer humanen Lymphoblastoid-Zelllinie und von Feng et al. [2003] in SV-40-transformierten humanen Fibroblasten untersucht. Hu et al. fanden dabei für die von ihnen untersuchten HNE-Addukte eine spezifische Adduktbildung an der dritten Base von Kodon 249 (-GAGG*C-) des *TP53*-Gens, wo in zahlreichen Tumoren spezifische G:C → T:A-Transversionen gefunden werden. Darüber hinaus wurde eine bevorzugte Bindung des HNEs an Kodon 174 beobachtet, welches dieselbe Sequenz wie Kodon 249 aufweist (-GAGG*C-) [Hu et al., 2002b]. Für die von HNE gebildeten Propano-dG-Addukte wurde ebenfalls eine spezifische Adduktbildung im Kodon 249 des *TP53*-Gens gefunden. In diesen Untersuchungen konnten die Autoren zudem die aus der spezifischen Adduktbildung resultierende G:C → T:A-Transversion explizit nachweisen [Feng et al., 2003] und folgerten aus ihren Ergebnissen, dass HNE ein wichtiger etiologischer Faktor für humane Tumore mit *TP53*-Mutationen im Kodon 249 sein kann. Für H₂O₂-induzierte Mutationen wurde die Frage nach Hot-Spots im *TP53*-Gen von Jenkins et al. [2001] in primären Fibroblasten und in einer Magenkarzinomzelllinie untersucht. Die Autoren analysierten Mutationen in neun Restriktionsstellen des *TP53*, darunter die fünf wichtigsten *TP53*-Hot-Spots, und fanden in beiden untersuchten Zelltypen eine H₂O₂-spezifische Schädigung von Kodon 247 und 248 (Exon 7).

1.4.4 Erfassung von DNS-Schäden

Wie in Abschnitt 1.4.1 ausgeführt, führt die direkte oder indirekte Wechselwirkung genotoxischer Substanzen mit der DNS zu unterschiedlichsten DNS-Schäden. Diese Schäden können durch die Erfassung verschiedener Parameter quantifiziert werden, wobei das Verhältnis zwischen DNS-Schädigung und biologischem Endpunkt für jede Noxe und jede Zellpopulation verschieden ist. Daher ist es ein erster wichtiger Schritt, die Empfindlichkeit bestimmter Zellen gegenüber schädigend wirkenden Substanzen zu identifizieren, um das zytotoxische, genotoxische und mutagene Potential dieser Stoffe zu erfassen. Ein Verfahren, das es ermöglicht die genotoxische Wirkung von Substanzen auf Einzelzellebene zu erfassen ist die Einzelzellgelelektrophorese, besser bekannt als Comet-Assay.

1.4.4.1 Comet-Assay: Schäden in der Gesamt-DNS

Der Comet-Assay ist innerhalb der letzten fünfzehn Jahre zu einer Standardmethode geworden, mit der sich DNS-Strangbrüche in individuellen Zellen visualisieren und quantifizieren lassen. Die Anwendungsmöglichkeiten des Comet-Assays reichen dabei von Untersuchungen zur Genotoxizität [Collins, 2002] und DNS-Reparatur [Collins und Harrington, 2002; Collins, 2004] bis hin zu Anwendungen im Bereich des Biomonitoring [Kassie et al., 2000; Moller et al., 2000] und der molekularen Epidemiologie [Berwick und Vineis, 2000; Sram und Binkova, 2000; Smith et al., 2003]. Der Comet-Assay zeichnet sich durch seine Vielseitigkeit und Sensitivität aus und ist gleichzeitig als Verfahren einfach, schnell und kostengünstig. Die Popularität der Methode beruht zu einem großen Teil darauf, dass sich DNS-Schäden in fast jeder Einzelzellpopulation messen lassen und dass bereits einige tausend Zellen für die Untersuchungen genügen. Eine Besonderheit des Comet-Assays ist, dass sich mit ihm die Heterogenität einer Zellpopulation hinsichtlich DNS-Schädigung oder DNS-Reparatur bestimmen lässt. So werden auch Subpopulationen von Zellen erfasst, die auf eine Behandlung unterschiedlich reagieren [Bock, 1999].

Die Methode des Comet-Assays wurde erstmals von Ostling und Johanson [1984] beschrieben und ist in unterschiedlicher Weise mehrfach modifiziert worden, um die Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit des Verfahrens zu erhöhen und die Quantifizierung der DNS-Schäden objektiv zu gestalten. Das Verfahren nach Ostling und Johanson diente dem Nachweis strahlungsinduzierter Doppelstrangbrüche im neutralen Milieu. Im Vergleich zu früher entwickelten Einzelzellmethoden [Rydberg und Johanson, 1978; Rydberg, 1984] ermöglichte die von Ostling und Johanson angewendete elektrophoretische Trennung der geschädigten DNS einen wesentlich empfindlicheren Nachweis von geringfügigen DNS-Schäden. Die heute weit verbreitete alkalische Version der Einzelzellgelelektrophorese wurde 1988 von Singh et al. eingeführt. Mit ihr lassen sich neben DNS-Doppelstrangbrüchen auch DNS-Einzelstrangbrüche

erfassen, da im Alkalischen die DNS-Doppelhelix denaturiert und entwunden wird, so dass einzelne DNS-Stränge im elektrischen Feld wandern können [Singh et al., 1988].

In seiner einfachsten Form werden beim Comet-Assay in Agarose suspendierte Zellen auf Objektträger aufgebracht, lysiert und einem schwachen elektrischen Feld ausgesetzt. Bei der Elektrophorese wandern die durch DNS-Schädigung entstandenen negativ geladenen DNS-Fragmente bzw. -Schleifen in Richtung Anode und bilden einen Schweif, während unfragmentierte DNS im Kern zurückbleibt. Das Erscheinungsbild der geschädigten Zellen als Kometen gab der Methode ihren Namen. Im Anschluss an die Elektrophorese wird die DNS mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und die Zellen werden unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In den einzelnen Zellen kann die Schweiflänge oder der prozentuale Anteil an DNS im Kometenschweif quantifiziert werden und in Summe Informationen über die betrachtete Zellpopulation liefern. Sowohl die Schweiflänge als auch der Anteil an DNS im Kometenschweif spiegeln die Zahl der in der Zelle vorliegenden DNS-Strangbrüche wider (Abbildung 10) [Tice et al., 2000; Olive, 2002].



Abbildung 10: Beispiel einer ungeschädigten, geschädigten und stark geschädigten HT29clone19a-Zelle.

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera.

Eine Reihe von Anstrengungen wurde unternommen, um die Bandbreite der mit dem Comet-Assay messbaren DNS-Schäden zu vergrößern. Während sich mit dem alkalischen Comet-Assay neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen alkalilabile Stellen, geschädigte DNS-Basen und Interstrang-Crosslinks nachweisen lassen [Collins, 2002], ermöglichen verschiedene Weiterentwicklungen der Methode die sensitive Erfassung spezifischer DNS-Schäden. So lassen sich durch Inkubation der Zellen mit Endonuklease III oxidierte Pyrimidinbasen und durch Inkubation mit Formamidopyrimidin-DNS-Glykosylase 8-Oxo-Guanin und weitere veränderte Purinbasen nachweisen und quantifizieren [Fortini et al., 1996; Collins et al., 1996]. Die Verwendung von Antikörpern oder DNS-Sonden erlaubt es schließlich spezifische DNS-Addukte oder DNS-Sequenzen zu detektieren. So können anschließend an den Comet-Assay die Kometen mit Antikörpern gegen inkorporiertes Bromdeoxyuridin [Olive und Banath, 1992] oder gegen bestimmte DNS-Addukte gefärbt werden [Sauvaigo et al., 1998]. Die Hybridisierung der Kometen-DNS mit fluoreszenzmarkierten DNS-Proben ist erstmals 1997 veröffentlicht und unter

der Bezeichnung Comet-FISH bekannt geworden [Santos et al., 1997] und ermöglicht die Erfassung von Schäden in spezifischen Genomabschnitten.

1.4.4.2 Comet-FISH: Schäden in spezifischen Genomabschnitten

Die Comet-FISH-Methode stellt eine Kombination von Comet-Assay und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung dar. Im Jahr 1997 wurde sie erstmals von Santos et al. [Santos et al., 1997] und ein Jahr später von McKelvey-Martin [McKelvey-Martin et al., 1998] publiziert. Während sich der Comet-Assay in den letzten Jahren zu einer Standardtechnik entwickelt hat, wird die noch relativ junge Comet-FISH-Methode nur in wenigen Laboren eingesetzt [McKelvey-Martin et al., 1998; McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b; Rapp et al., 2000; Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b]. Durch die Kombination des Comet-Assays mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ist neben der Quantifizierung der generellen DNS-Schäden eine gleichzeitige Bestimmung der regiospezifischen Empfindlichkeit der DNS möglich. Die Detektion von DNS-Strangbrüchen bei simultaner Lokalisierung spezifischer Chromosomen, Chromosomenregionen oder Gene ermöglicht unter anderem die Bruchempfindlichkeit der Gesamt-DNS mit der regiospezifischen Empfindlichkeit einzelner Genombereiche vergleichen zu können [Rapp et al., 2000; Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b].

Für die Comet-FISH Methode wird bisher die alkalische Version des Comet-Assays eingesetzt, die sich an den Arbeiten von Singh [Singh et al., 1988] und Tice [Tice et al., 1990] orientiert und an die jeweilige Fragestellung angepasst wird. Dabei wird im Anschluss an den Comet-Assay die in den Gelen aufgetrennte DNS mit direkt oder indirekt markierten Sonden hybridisiert, wobei sich als DNS-Sonden neben Ganzchromosomenproben [Rapp et al., 2000], Telomer- und Zentromerproben [Santos et al., 1997] auch genspezifische DNS-Sonden [McKelvey-Martin et al., 1998; McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b; Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b] verwenden lassen. Die in-situ-Hybridisierung nutzt dabei den doppelsträngigen Charakter der DNS, die durch molekulare Interaktionen der zueinander passenden Einzelstränge einen sequenzspezifischen Doppelstrang bildet. Gibt man DNS-Sonden bekannter Sequenz auf ein Genom und überführt beide in Einzelstränge, so bildet sich bei der Renaturierung eine Bindung zwischen der markierten DNS-Sonde und dem dazu in der DNS-Sequenz komplementären Genombereich. Diese Formation wird als Hybrid bezeichnet, da sie zu einer Hälfte aus der originalen DNS und zur anderen Hälfte aus der zugegebenen Sonde besteht [Lichter et al., 1988]. Verwendet man direkt fluoreszenzmarkierte Sonden oder detektiert die indirekt markierten Sonden unter Verwendung von Fluorochromen, so lässt sich schließlich die Anzahl und Lage der Signale in den Zellen und Kometen fluoreszenzmikroskopisch erfassen. Die auf diesem Wege erhaltenen Daten lassen nach statistischer Auswertung Rückschlüsse auf regiospezifische Schäden in dem untersuchten Genombereich zu. Bei der Auswertung der Comet-FISH-Daten stellt sich die Frage, ob regiospezifische Schäden zufällig oder nach

bestimmten Mustern induziert werden. Eine mögliche Ursache für eine nicht-zufällige Verteilung von chromosomen- bzw. genspezifischen Schäden kann dabei die Dichte der aktiven Gene auf den einzelnen Chromosomen sein [Rapp et al., 2000].

1.4.4.3 Genspezifische Schäden und Genaktivität

ESTs (estimated sequence tags) sind willkürliche DNS-Sequenzen im humanen Genom und stellen die Arbeitswerkzeuge in Genomsequenzierungsprojekten dar. ESTs werden gewonnen, indem mRNA aus Zellen isoliert, durch RT-PCR (Reverse Transkriptions-Polymerasekettenreaktion) in cDNA umgewandelt und diese schließlich sequenziert wird. Die EST-spezifischen Informationen, die aus den bis zu mehreren hundert Basenpaaren langen Sequenzen erhalten wurden, werden in Datenbanken gesammelt und ermöglichen die Erstellung von EST-Karten für das Genom. Da die EST-Daten aus mRNA gewonnen wurden, entspricht die EST-Dichte eines Chromosoms der Dichte aktiver, exprimierter Gene. Nimmt man im Genom eine Gleichverteilung der aktiven Gene an, so lässt sich entsprechend der physikalischen Länge eines Chromosoms eine zu erwartende Anzahl aktiver Gene errechnen. So setzten Deloukas et al. [1998] die tatsächlich beobachtete Zahl aktiver Gene (ausgedrückt als expressed sequence tags; ESTs) mit der errechneten Zahl ins Verhältnis und fanden, dass die Gendichte für die Chromosomen 1, 11, 17, 19 und 22 signifikant höher und die für die Chromosomen 4, 5, 8, 18 und X signifikant niedriger ist als erwartet. Für die nicht aufgeführten Chromosomen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen errechneter und beobachteter EST-Dichte [Deloukas et al., 1998].

Die Frage, ob die durch unterschiedliche Noxen induzierten DNS-Schäden zufällig verteilt im Genom auftreten oder nach bestimmten Mustern induziert werden, wurde vor allem für physikalische Noxen untersucht. Für UV-A-induzierte Schäden in humanen Lymphozyten fanden Rapp et al. [2000] einen inversen Zusammenhang zwischen spezifischer Bruchempfindlichkeit und der Genaktivität der von ihnen untersuchten Chromosomen. Genärmere Chromosomen wiesen also mehr UV-A-induzierte Chromosomenbrüche auf als genreichere Chromosomen. Im Gegensatz dazu wurde für Röntgenstrahlung gefunden, dass diese vor allem in genreicheren Regionen Schäden setzt, was für einen generell anderen Schädigungsmechanismus spricht [Tucker und Senft, 1994; Slijepcevic, 2004]. Für ROS und Lipidperoxidationsprodukte wurde der Zusammenhang zwischen spezifischen Schädigungsmustern und der EST-Dichte der jeweiligen Chromosomen noch nicht untersucht. Hinsichtlich der kolorektalen Karzinogenese wäre vor allem ein Zusammenhang zwischen ernährungsbedingten, endogen gebildeten genotoxischen Substanzen, möglichen regionspezifischen Schäden im *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen und der EST-Dichte auf den Chromosomen 5, (*APC*), 12 (*KRAS*) bzw. 17 (*TP53*) interessant.

2 PROBLEM- UND ZIELSTELLUNG

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollten ernährungsbedingte, endogene Risikofaktoren in den Zielzellen und Zielgenen der humanen Kolonkarzinogenese untersucht werden, um auf molekularer Ebene zu einem vertieften Verständnis der einzelnen Schritte dieses komplexen, mehrstufigen Prozesses zu gelangen. Der Schwerpunkt der praktischen Arbeiten war dabei auf die Interaktionen der Risikofaktoren mit den für die kolorektale Karzinogenese relevanten Genen gelegt. Dazu sollte die am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie neu zu etablierende Comet-FISH-Methode erstmals in breit angelegten Versuchsreihen zur vergleichenden Quantifizierung genspezifischer DNS-Schäden in unterschiedlichen Kolonzellen genutzt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

- 1.) eine Methode zur Aufarbeitung humaner Kolongewebeproben zu etablieren, die es erlauben würde Primärzellen für die nachfolgenden Comet-Assay- bzw. Comet-FISH-Untersuchungen zu gewinnen,
- 2.) die generell DNS-schädigende Wirkung relevanter, endogen aufgrund einer bestimmten Ernährung gebildeter Risikofaktoren (H_2O_2 , Hexenal, HNE) in primären Kolonzellen, LT97-Kolonadenomzellen bzw. HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen mittels Comet-Assay zu quantifizieren und dadurch die Zellmodelle in ihrer Sensitivität und Reparaturaktivität zu charakterisieren sowie
- 3.) die durch die ausgewählten Modellsubstanzen induzierten genspezifischen Schäden in den für die Kolonkarzinogenese relevanten Genen (*APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*) mittels Comet-FISH zu quantifizieren und dadurch die genspezifischen Sensitivitäten der verwendeten Kolonzellen zu erfassen.

Im ersten Teil der Arbeit galt es die Aufarbeitung humaner Kolongewebeproben am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der FSU Jena zu etablieren. Ziel war die Erarbeitung eines Protokolls zur Gewinnung primärer Kolonzellen und Kolonkrypten mit sehr guter Vitalität. Für die Primärzellen sollten sowohl Aufarbeitungsprotokoll als auch weitere Aufreinigungsmöglichkeiten hinsichtlich Zellvitalität und DNS-Basisschadensrate optimiert werden, um die bestmögliche Verwendbarkeit der isolierten Primärzellen in den nachfolgenden Testsystemen zu gewährleisten. Die isolierten Kolonkrypten sollten hinsichtlich Vitalität, Apoptose und Zerfall charakterisiert werden, um anhand dieser Parameter Verwendungsmöglichkeiten für weitergehende Versuche zu benennen. Im Rahmen der Methodenetablierung sollten auch verschiedene Möglichkeiten zur kurzfristigen bzw. langfristigen Aufbewahrung des Gewebematerials untersucht und miteinander verglichen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die primären Kolonzellen neben LT97- und HT29clone19a-Zellen in ihrer Sensitivität und Reparaturkapazität gegenüber ausgewählten Risikofaktoren der ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese charakterisiert werden. Dazu wurden Wasserstoffperoxid (H_2O_2), trans-2-Hexenal und 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) als relevante Modellschadstoffe ausgewählt, die die aufgrund von oxidativem Stress vorliegenden reaktiven Sauerstoffspezies (H_2O_2) bzw. sekundär gebildeten reaktiven Lipidperoxydationsprodukte (Hexenal und HNE) repräsentieren. Unter Verwendung dieser Testsubstanzen sollten in allen Zellmodellen Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge erstellt werden, um eine geeignete Konzentration für die Reparaturversuche zu ermitteln. Als sensitive Methode zur Quantifizierung der induzierten DNS-Schäden wurde der Comet-Assay genutzt. Die Comet-Assay-Ergebnisse sollten schließlich Aussagen zur genotoxischen Wirkung der untersuchten Modellschadstoffe, sowie zur zellspezifischen Sensitivität und Reparaturkapazität zulassen.

Für den dritten Teil der Arbeit sollte die relativ junge Methode des Comet-FISH, eine Kombination aus Comet-Assay und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena etabliert werden. Die Comet-FISH Experimente sollten zeigen, inwiefern die verwendeten Modellschadstoffe spezifische Schäden in den Tumorsuppressorgenen *APC* und *TP53* bzw. im Protoonkogen *KRAS* setzen, die die wichtigsten Zielgene der kolorektalen Karzinogenese darstellen. Eine Gegenüberstellung von genspezifischen und globalen DNS-Schäden sollte eine Aussage zur spezifischen Sensitivität der einzelnen Gene zulassen, wobei vor allem ein möglicher Zusammenhang zwischen dieser genspezifischen Empfindlichkeit und der Dichte aktiver Gene auf den jeweiligen Chromosomen interessierte. Die weitere statistische Auswertung der Comet-FISH-Daten sollte den Vergleich des *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gens sowie eine vergleichende Betrachtung der genspezifischen Zellsensitivitäten ermöglichen. Ferner sollte ein Protokoll für 2-Farben- und 3-Farben-FISH-Versuche mit *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden erarbeitet und die Effektivität dieses Mehrfarben-FISHs gegenüber dem Arbeiten mit nur einer Gensonde abgeschätzt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Humane Kolonzellen

3.1.1.1 Zelllinien

3.1.1.1.1 HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen

Die HT29clone19a-Zellen sind ein Klon der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29, die 1964 von Fogh und Trempe [1975] aus dem Kolontumor einer 44 Jahre alten Patientin etabliert wurde. Die HT29-Stammzellen sind undifferenziert und entsprechen einem sehr späten Stadium der kolorektalen Karzinogenese. Die HT29clone19a-Zellen wurden durch Behandlung der HT29-Stammzellen mit 5 mM Natriumbutyrat rückdifferenziert, wobei keine Aussagen über den tatsächlichen Differenzierungsgrad vorliegen [Augeron und Laboisie, 1984]. Unter standardisierten Zellkulturbedingungen wachsen die HT29clone19a-Zellen adhärent mit einer Generationszeit von 24 h.

3.1.1.1.2 LT97-Kolonadenomzellen

Die humane Kolonadenomzelllinie LT97 wurde 1997 von B. Marian aus Mikroadenomen einer FAP-Patientin etabliert. Bei diesen Zellen handelt es sich um differenzierte Epithelzellen, die dem Adenomstadium der kolorektalen Karzinogenese entsprechen. In Zellkultur wachsen die LT97-Zellen adhärent in dreidimensionalen Strukturen. Die Generationszeit beträgt 72-96 h [Richter et al., 2002].

3.1.1.2 Primärmaterial aus Kolongewebeproben

Die für die Versuche verwendeten humanen Primärzellen wurden sowohl aus Kolonbiopsien als auch aus Kolongewebe isoliert.

3.1.1.2.1 Humane Kolonbiopsien

Die Kolonbiopsien wurden, mit Einverständnis der Patienten, im Rahmen von Kolonoskopien entnommen und von der Gastroenterologischen Abteilung der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wurde zusätzlich zu den für die medizinischen Untersuchungen notwendigen Biopsien entnommen, wobei diese zusätzliche Entnahme von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt wurde. Bei dem Biopsiematerial handelte es sich um gesundes, histologisch unauffälliges Gewebe. Die Biopsien wurden in HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) auf Eis aufbewahrt und nach der Entnahme so schnell wie möglich aufgearbeitet.

3.1.1.2.2 Humanes Kolongewebe

Das humane Kolongewebe wurde, mit Einverständnis der Patienten, von der Allgemeinen und Viszeralen Chirurgie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung

gestellt. Bei dem Gewebe handelte es sich um gesundes, histologisch unauffälliges Gewebe, das aus medizinischen Gründen bei den Operationen mit entfernt wurde. Die Versuche wurden von der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt. Das Kolongewebe wurde nach der Entnahme in HBSS aufbewahrt, auf Eis transportiert und innerhalb einer Stunde nach der Entnahme aufgearbeitet.

3.1.2 Testsubstanzen

3.1.2.1 Wasserstoffperoxid

H₂O₂ wurde in Konzentrationen von 0-150 µM verwendet, wobei die Gebrauchslösungen durch Verdünnung einer 30 %-igen H₂O₂-Lösung in PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) hergestellt wurden.

3.1.2.2 Trans-2-Hexenal

Hexenal wurde in Konzentrationen von 0-1600 µM verwendet. Die Hexenal-Stammlösungen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) angesetzt, die Gebrauchslösungen mit einer DMSO-Konzentration von 1 µl/ml in RPMI.

3.1.2.3 4-Hydroxy-2-nonenal

4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) wurde in Konzentrationen von 0-250 µM verwendet. Die HNE-Stammlösungen wurden in Ethanol (EtOH) bzw. in DMSO angesetzt, die Gebrauchslösungen in RPMI. Die Ethanolkonzentration in den Gebrauchslösungen betrug < 25 µl/ml, die DMSO-Konzentration 1 µl/ml. Zu Beginn der Arbeiten mit HNE (April 2000) wurde in EtOH gelöstes HNE von Sigma/Calbiochem (1 mg/ml) bezogen und für die Comet-Assay- und Comet-FISH-Versuche verwendet. Ab Herbst 2000 wurde von der Arbeitsgruppe Prof. E. Eder (Institut für Toxikologie der Universität Würzburg) freundlicherweise HNE-Dimethylacetal zur Verfügung gestellt, aus dem das benötigte HNE selbst hergestellt werden konnte. Der große Vorteil dabei lag in der freien Wahl des Lösungsmittels (EtOH bzw. DMSO) und in der freien Wahl der HNE-Konzentration in der Stammlösung.

3.1.3 DNS-Sonden

3.1.3.1 Kommerzielle Sonden

Die digoxigenin-markierte (dig-markierte) *TP53*-Sonde ist eine DNS-Sonde von Oncor (Gaithersburg, UK) bestand aus einer Mischung dig-markierter spezifischer DNS-Sequenzen, die den *TP53*-Lokus (17p13.1) umfassten. Insgesamt überspannte die Sonde einen 80 kb-Bereich. In Interphasenkernen wurde mit dieser Sonde ein klar erkennbares Signal erhalten.

Die mit FITC (Fluoresceinisoithiocyanat) markierten Ganzchromosomenproben für Chromosom 17 und Chromosom 18 von Oncor bestanden aus einer Mischung FITC-markierter spezifischer DNS-Sequenzen, die die gesamte Länge des Zielchromosoms überspannten. Mit den Ganzchromosomenproben wurde in Interphasenkernen ein diffuses Signal erhalten.

3.1.3.2 Nicht-kommerzielle Sonden

Durch Mikrodissektion gewonnene, dig-markierten *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. U. Claussen (Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt. Die Sonden bestanden aus einer Mischung dig-markierter spezifischer DNS-Sequenzen, die den jeweiligen Gen-Lokus umfassten. Insgesamt deckte die *APC*-Sonde den Bereich von 5q13-q31 ab, die *KRAS*-Sonde den Bereich von 12pter-p11.2 und die *TP53*-Sonde den Bereich 17pter-p12. In Interphasenkernen wurde mit diesen Sonden ein klar umrissenes Signal gefunden.

Die direktmarkierten (FITC- bzw. TexasRed-markierten) *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. U. Claussen (Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt wurden, bestanden aus einer Mischung direktmarkierter spezifischer DNS-Sequenzen, die den jeweiligen Genlokus umfassten. Insgesamt überspannten die Sonden den Bereich von 5q13-q31 (*APC*), von 12pter-p11.2 (*KRAS*) bzw. von 17pter-p12 (*TP53*). In Interphasenkernen ergaben diese Sonden ein klar umrissenes Signal.

3.1.4 Sonstiges

Alle verwendeten Geräte, Arbeitsmittel, Chemikalien und Reagenzien, Lösungen und Puffer sowie die verwendete Mess- und Auswertungssoftware sind im Anhang I (Material) aufgeführt.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit Kolonzelllinien

Die Zellen der Kolonzelllinien wurden unter standardisierten Bedingungen im Brutschrank kultiviert (37 °C; 95 % Luftfeuchte; 5 % CO₂). Alle Arbeiten im Zusammenhang mit der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-air-flow-Werkbank auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur vortemperierte. In regelmäßigen Abständen wurde die Zellkultur auf Mykoplasmen getestet. Zum einen wurde ein Mykoplasmentest mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) [Jagielski et al., 1976], zum anderen ein Mykoplasmentest auf PCR-Basis durchgeführt (Mycoplasma-PCR-Detection-Kit VenorGeM, Minerva Biolabs, Berlin).

3.2.1.1 HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen

Die HT29clone19a-Zellen wurden als Adhäsionskulturen in Polystyrol-Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert, dem 10 % hitzeinaktiviertes Fötales Kälberserum (FCS) sowie 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep) zugesetzt waren. Etwa jeden zweiten Tag wurde das verbrauchte Medium erneuert (6 ml für die 25 cm²-Flasche bzw. 15 ml für die 75 cm²-Flasche), indem der Kulturüberstand

vollständig abgesaugt und durch vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt wurde. Alle 3-4 Tage, wenn die Zellkulturflasche subkonfluent bewachsen war, wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurde das alte Medium mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt und die Zellen mit 3 ml bzw. 6 ml Trypsin/Versen-Lösung für 4 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Inkubation mit Trypsin/Versen werden die Adhäsionsproteine an den Zelloberflächen gespalten bzw. deaktiviert und die Zellen kugeln sich ab, bleiben aber noch adhärent. Die Zellen wurden ohne Trypsin/Versen-Lösung weitere 4 min bei 37 °C inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösten. Das Trypsin/Versen wurde durch Zugabe von Medium inaktiviert und die Zellen je nach Bedarf 1:5 bis 1:10 geteilt. Die in der Zellkulturflasche verbleibende Zellsuspension wurde mit Zellkulturmedium auf 6 ml bzw. 15 ml aufgefüllt und unter standardisierten Bedingungen weiter inkubiert. Für die Experimente wurden Zellen der Passage 25-45 verwendet.

Für die Zellaussaat wurden Einzelzellsuspensionen gewonnen, auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und für die Aussaat verwendet. Die Aussaat in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) erfolgte mit 3 ml Zellsuspension, die in große Zellkulturflaschen (75 cm²) mit 5 ml Zellsuspension. Die ausgesäten Zellen wurden 24 h unter standardisierten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.1) im Brutschrank kultiviert, bevor das Medium gewechselt und die nicht angewachsenen Zellen entfernt wurden. Die HT29clone19a-Zellen wurden wachsen gelassen, bis eine etwa 80 %-ige Konfluenz des Zellrasens erreicht war. Danach erfolgte die Ernte zur Durchführung der Versuche.

3.2.1.2 LT97-Kolonadenomzellen

Die LT97-Kolonadenomzellen wurden als Adhäsionskulturen in Polystyrol-Zellkulturflaschen (25 cm² bzw. 75 cm²) in LT97-Komplettmedium kultiviert, das aus MCDB-Medium bestand, dem neben 20 % L-15 Leibovitz Medium (+ Glutamin), 2 % hitzeinaktiviertes FCS und 1 % PenStrep eine Reihe weiterer Faktoren zugesetzt waren (10 µg/ml Insulin, 2×10^{-10} M Trijodthyronin, 2 µg/ml Transferrin, 1 µg/ml Hydrocortison, 5×10^{-9} M Natriumselenit, 0,03 g/ml EGF). Nach Bedarf wurde 2-3 mal pro Woche das Medium erneuert (6 ml für die 25 cm² Flasche bzw. 15 ml für die 75 cm² Flasche) indem der verbrauchte Kulturüberstand vollständig abgesaugt und durch vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt wurde.

Alle 3-4 Wochen, wenn die Zellkulturflasche subkonfluent bewachsen war, wurden die Zellen umgesetzt. Dabei war zu beachten, dass bei den LT97-Zellen Einzelzellen und Aggregate < 5 Zellen nicht überleben. Das alte Medium wurde mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit PBS/Na₂EDTA-Lösung (3 ml bzw. 6 ml) gewaschen, wodurch die für die Zelladhäsion notwendigen Ca²⁺-Ionen chelatisiert und entfernt wurden. Die Zellen wurden mit 0,5 ml bzw. 1,5 ml frischer PBS/Na₂EDTA-Lösung bei 37 °C solange inkubiert, bis sich Zellaggregate durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösten (4-10 min). Die Zugabe von

Zellkulturmedium stoppte die Zellvereinzelung und die Zellenaggregate wurden vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in neue Flaschen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden mit Zellkulturmedium auf 6 ml bzw. 15 ml aufgefüllt. Die neu ausgesäten LT97-Zellen setzten sich sehr langsam und hafteten auch nur langsam an (24-48 h). Zellaggregate, die nach 48 h noch nicht angewachsen waren, wurden durch Mediumwechsel entfernt. Für die Experimente wurden Zellen der Passage 12-24 verwendet.

Um LT97-Einzelzellsuspensionen zu gewinnen wurde das Medium aus einer etwa 80 % konfluent gewachsenen Zellkulturflasche mit einer Pasteurpipette vollständig abgesaugt, der Zellrasen mit PBS/Na₂EDTA-Lösung (3 ml bzw. 6 ml) gewaschen und die PBS/Na₂EDTA-Lösung wieder abgesaugt. Die Zellen wurden für 4 min mit 3 ml bzw. 6 ml Trypsin/Versen-Lösung und weitere 4 min ohne Trypsin/Versen-Lösung bei 37 °C inkubiert, bis sie sich durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden lösten. Nach Suspendieren der Zellen in LT97-Zellkulturmedium ließen sich die noch vorliegenden Aggregate durch mehrmaliges Aufsaugen mit einer Pipette vereinzeln. Lagen die Zellen noch nicht ausreichend vereinzelt vor, wurden die Aggregate abzentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4 °C), in Trypsin/Versen resuspendiert, für 4 min bei 37 °C inkubiert und nach Abstoppen der Reaktion mit LT97-Komplettmedium ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4 °C).

Für die Zellaussaat wurden die Suspensionen mit LT97-Zellaggregaten immer auf eine etwa gleiche Aggregatzahl pro ml eingestellt und für die Aussaat verwendet. In 6-Well-Platten erfolgte die Aussaat mit 1 ml LT97-Suspension pro Well, in Zellkulturflaschen mit 3 ml bzw. 5 ml LT97-Zellaggregatsuspension (25 cm² bzw. 75 cm²-Flaschen). Die ausgesäten Zellen wurden 48 h unter standardisierten Bedingungen (siehe Abschnitt 3.2.1) im Brutschrank kultiviert, bevor das Medium gewechselt und die nicht angewachsenen Zellen entfernt wurden. Die LT97-Zellen wurde wachsen gelassen, bis eine etwa 80 %-ige Konfluenz des Zellrasens erreicht war. Dann wurden die Zellen inkubiert (6-Well-Platten) und für Versuche geerntet.

3.2.2 Aufarbeitung, Aufbewahrung und Aufreinigung humaner Kolongewebeproben

Die aus den Patientendatenblättern zusammengestellten Daten zu den Kolonbiopsien und Kolongewebeproben finden sich im Anhang II (Tabelle 14 und 15).

3.2.2.1 Aufarbeitung von Kolonbiopsien

Zur Isolierung von Kolonkrypten wurden die Kolonbiopsien dem HBSS entnommen und auf einem Uhrglas mit einer Schere zerkleinert. Das Gewebekomogenisat wurde in HBSS aufgenommen und in ein 15 ml Tube überführt. Nach Zusatz von 2 mg/ml Proteinase K und 1 mg/ml Collagenase P wurde das Gewebe bei 37 °C enzymatisch verdaut (15-60 min). Der Fortgang des Enzymverdaus wurde an entnommenen Proben unter dem Mikroskop verfolgt. Der Verdau wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens an HBSS beendet und die Suspension abzentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde vorsichtig in dem gewünschten

Medium resuspendiert und die Kolonkrypten bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Um primäre Kolonzellen zu erhalten wurden die Kolonbiopsien, wie für die Krypten beschrieben, mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut. Im Anschluss an den auf 30-60 min verlängerten Verdau wurden eventuell noch vorliegende Zellaggregate durch mehrfaches Aufziehen mit einer Eppendorffpipette disaggregiert. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

3.2.2.2 Aufarbeitung von Kolongewebe

Die Aufarbeitung von Kolongewebe wurde im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena neu etabliert. Daher wurden zu Anfang, neben der Ausarbeitung der Aufarbeitungsprotokolle, grundlegende Daten zur Gewebeaufarbeitung gewonnen. Dazu zählte die Zahl der Zellen und Krypten, die pro Gramm Kolonepithel isoliert werden konnte sowie die Auswirkung des Enzymverdaus, der Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf die Vitalität und DNS-Basisschadensrate der isolierten Zellen. Ebenso wurde die kurz- und langfristige Lagerung von Primärzellen, Krypten und Epithelstreifen getestet und die jeweilige Auswirkung auf Zellvitalität und DNS-Basisschadensrate quantifiziert.

Zur Gewinnung von Kolonepithelstreifen wurde die Gewebeprobe aufgeschnitten, anhängendes Fettgewebe entfernt und das Gewebe mit HBSS mehrfach gespült. Das Kolongewebe wurde mit der Epithelschicht nach oben auf ein Uhrglas gegeben und mit einer Spritze vorsichtig HBSS unter die Epithelschicht gespritzt (etwa 1 ml/cm²). Das Epithel ließ sich dann mit einer Pinzette anheben und mit einer Schere streifenweise abschneiden. Die Epithelstreifen wurden in kaltem HBSS gesammelt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Um Kolonkrypten zu gewinnen wurden die Epithelstreifen mit HBSS gespült, auf ein Uhrglas gegeben und mit einer Schere zerkleinert. Das weitere Vorgehen entspricht dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Arbeitsschritten. Abweichend betrug die Verdauzeit 30-60 min. Zur Isolierung von primären Kolonzellen wurden die Kolonepithelstreifen mechanisch zerkleinert und enzymatisch verdaut. Während der 60-120 min Verdauzeit wurde die Suspension alle 30 min durch mehrfaches Aufziehen mit einer Eppendorffpipette nochmals disaggregiert. Nach Beendigung des Enzymverdaus wurde die Suspension zur Abtrennung größerer Zellaggregate durch ein Stahlsieb gegeben.

3.2.2.3 Aufbewahrung von Primärmaterial

Neben der sich direkt an die Gewebeaufarbeitung anschließenden Verwendung der primären Kolonkrypten und Kolonzellen wurde versucht, nicht benötigtes Material für spätere Versuche aufzubewahren, um die Versuchsplanung flexibler gestalten zu können. Als eine Möglichkeit wurde die kurzfristige Aufbewahrung der primären Kolonzellen, Krypten und Epithelstreifen über Nacht bei 4 °C in HBSS untersucht, als andere Möglichkeit das Einfrieren bei -130 °C als

langfristige Aufbewahrung. Sowohl primäre Kolonzellen, als auch Krypten und Kolonepithelstreifen wurden kurzfristig in HBSS über Nacht bei 4 °C auf Eis aufbewahrt und am nächsten Morgen für Versuche verwendet. Bei den über Nacht aufbewahrten primären Kolonzellen wurden Vitalität und Zellzahl mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt und die DNS-Basisschadensrate im Comet-Assay untersucht. Die über Nacht auf Eis aufbewahrten Krypten wurden nach Anfärbung mit Trypanblau unter dem Mikroskop auf strukturelle Integrität und Vitalität hin untersucht. Bei den kurzfristig aufbewahrten Kolonepithelstreifen erfolgte die Aufarbeitung wie unter 3.2.2.2 beschrieben. Von den nach Enzymverdau gewonnenen Zellsuspensionen wurden Vitalität und Zellzahl mit Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Die DNS-Basisschadensrate der Zellen wurde im Comet-Assay untersucht.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden sowohl primäre Kolonzellen als auch Kolonepithelstreifen eingefroren, bei -130 °C aufbewahrt und bei Bedarf wieder aufgetaut. Zum Einfrieren der Epithelstreifen wurden zwei unterschiedliche Einfriermedien getestet und miteinander verglichen. Einfriermedium 1 setzte sich aus 59 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO und 1 % PenStrep zusammen, Einfriermedium 2 aus 59 % DMEM, 30 % FCS, 10 % DMSO und 1 % PenStrep. Die primären Kolonzellen wurden in Einfriermedium 1 eingefroren. Zum Einfrieren der Primärzellen wurden die jeweiligen Suspensionen abzentrifugiert (5 min, 1400 rpm, 4 °C), die Pellets im Einfriermedium resuspendiert und in Kryotubes aliquotiert (Zellzahl der Primärzellen von 6×10^6 Zellen/ml). Die Tubes wurden mit einer Temperaturabsenkung von -1 °C/min in Nalgene®-Kryocontainern bei -80 °C eingefroren und langfristig bei -130 °C aufbewahrt. Für die Verwendung in Versuchen wurden die Tubes mit den eingefrorenen Zellen bzw. Krypten zügig auf Raumtemperatur erwärmt und die Suspensionen abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT). Die Pellets wurden im gewünschten Medium resuspendiert und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Zum Einfrieren der Kolonepithelstreifen wurde das jeweilige Einfriermedium in den Kryotubes vorgelegt und 4-6 Epithelstreifen in jeden Tube gegeben. Die Epithelstreifen wurden in Nalgene®-Kryocontainern bei -80 °C mit einer Temperaturabsenkung von -1 °C/min eingefroren und nach 24 Stunden zur langfristigen Aufbewahrung in die -130 °C Tiefkühltruhe überführt. Zum Auftauen der Epithelstreifen wurden die Tubes zügig auf Raumtemperatur erwärmt. Die Epithelstreifen wurden mit einer Pinzette aus dem Einfriermedium entnommen und in HBSS überführt. Die weitere Aufarbeitung zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen erfolgte analog zu Abschnitt 3.2.2.2.

3.2.2.4 Aufreinigung der Primärzellsuspensionen

Im Anschluss an den enzymatischen Gewebeverdau wurde die weitere Aufreinigung der Primärzellsuspensionen durch Erythrozytenlyse, Dichtegradientenzentrifugation bzw. magnetische Zellseparation untersucht.

Einige Einzelzellsuspensionen enthielten nach dem Enzymverdau sehr viele Erythrozyten, was an einer Rotfärbung des jeweiligen Zellpellets zu erkennen war. Diese wurden durch Behandlung mit Erythrozytenlysepuffer entfernt. Bei diesem Verfahren wird das Zellpellet für kurze Zeit einer isotonischen Ammoniumchloridlösung ausgesetzt, wobei die roten Blutkörperchen aufgrund ihrer erhöhten Permeabilität für Ammoniumionen zuerst lysieren. Die Zellpellets wurden in 5 ml des Lysepuffers suspendiert und 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lyse durch Zugabe von 45 ml HBSS gestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, anschließend in HBSS resuspendiert sowie Zellzahl und Zellvitalität bestimmt. Die DNS-Basisschadensrate der Zellen wurde mittels Comet-Assay quantifiziert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Zellen auf Eis aufbewahrt.

Zur weiteren Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden 10 ml Histopaque 1.077 in einem 50 ml-Tube vorgelegt und vorsichtig mit dem gleichen Volumen Primärzellsuspension überschichtet, so dass sich die zwei Lagen nicht vermischten. Anschließend wurde der Tube 30 min bei 2000 rpm (4 °C) ohne Bremse zentrifugiert. Während der Zentrifugation wanderten Erythrozyten und tote Zellen auf den Boden des Röhrchens und die primären Kolonzellen reicherten sich in der Schicht zwischen dem Histopaque 1.077 und dem HBSS an. Die Primärzellen wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abpipettiert, einmal mit 20 ml HBSS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in HBSS resuspendiert und Zellzahl und Zellvitalität bestimmt. Die DNS-Basisschadensrate dieser Zellen wurde mittels Comet-Assay quantifiziert.

Durch magnetische Zellseparation mittels beadgekoppelter Antikörper sollten die epithelialen Kolonzellen aus den Zellsuspensionen abgetrennt werden. 60 µl der beadgekoppelten Antikörper (DynaBeads® BerEP4 anti-epithelial cell) (7×10^8 Beads/ml) wurden in einen Eppendorfftube überführt und mittels MPC-Vorrichtung (Magnetic Particle Concentrator) mit 1,5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die beadgekoppelten Antikörper in 60 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml der Primärzellsuspension vermischt. Der Tube wurde 30 min schüttelnd auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Tube in der MPC-Vorrichtung platziert, der Überstand nach 1 min in einen anderen Tube überführt und bis zur Auswertung auf Eis aufbewahrt. Die Zell-Bead-Komplexe wurden einmal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS suspendiert. Sowohl der nach der Separation abgenommene Überstand, als auch die Suspension mit den Zell-Bead-Komplexen wurden auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Bei 100-facher Vergrößerung wurden unter einem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 25) Zellzahl, Zellvitalität und Güte der Separation bestimmt. Zu Vergleichszwecken wurden parallel zu den Primärzellen stets HT29clone19a-Zellen mitgeführt.

3.2.3 Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Für die Zellaussaat und die Inkubation der Zellen mit Testsubstanzen ist die Bestimmung der Zellzahl unabdingbar. Auch die Bestimmung der Zellvitalität ist wichtig, um auszuschließen, dass beobachtete genotoxische Effekte auf Zytotoxizität zurückzuführen sind. In den Versuchssystemen wurden ausschließlich Zellen mit einer Vitalität > 80 % eingesetzt.

3.2.3.1 Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau

Die Trypanblau-Ausschlussfärbung ist ein einfaches Verfahren zur Unterscheidung vitaler und toter Zellen. Als Kriterium für den Zelltod dient hier die Zerstörung der Zellmembran, wie sie infolge des nekrotischen Zelltods auftritt. Infolgedessen kann das Trypanblau in die Zellen eindringen und färbt deren Zytoplasma blau. Vitale Zellen mit intakter Membran nehmen Trypanblau nicht auf und erscheinen bei lichtmikroskopischer Betrachtung hell leuchtend [Sandström, 1965]. Zur Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität wurde ein Aliquot der Zell- bzw. Krypt suspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgegeben. Bei 100-facher Vergrößerung wurden unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiovert 25) mindestens 100 Zellen bzw. 20 Krypten ausgewertet. Die Zellzahl pro mm^2 -Zählquadrat wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors mit 2×10^4 multipliziert, um die Zellzahl/ml Medium zu erhalten, aus der sich die Gesamtzellzahl errechnete. Die Vitalität der Zellen und Krypten ergab sich prozentual aus dem Verhältnis der toten Zellen zur Gesamtzellzahl, wobei die Gesamtzellzahl der Krypten mit 250 veranschlagt wurde [Potten und Loeffler, 1990].

3.2.3.2 Vitalität mit Fluoresceindiacetat/Ethidiumbromid

Die Vitalitätsbestimmung mit Fluoresceindiacetat (FDA)/Ethidiumbromid basiert auf der Kombination zweier Fluoreszenzfarbstoffe, FDA und Ethidiumbromid. Für den Test wurden Zellen bzw. Krypten mit FDA und Ethidiumbromid versetzt. Zellen, die vital und metabolisch kompetent sind, können die Acetatgruppen des FDA abspalten, wodurch farbloses FDA in grün fluoreszierendes Fluorescein umgesetzt wird. Ethidiumbromid diffundiert hingegen durch die geschädigte Plasmamembran nekrotischer Zellen hindurch und färbt die DNS der toten Zellen an, wodurch diese rot fluoreszieren. Die toten und lebenden Zellen lassen sich so unterm Fluoreszenzmikroskop leicht unterscheiden und auszählen. Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde ein Aliquot der Zell- bzw. Krypt suspension im Verhältnis 1:1 mit der FDA-Ethidiumbromid-Gebrauchslösung vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Je 30 μl der Suspension wurden auf Super Frosted Slides gegeben und mit einem Deckgläschen verteilt. Bei 100-facher Vergrößerung wurden 100 Zellen bzw. 20 Krypten pro OT fluoreszenzmikroskopisch (Zeiss Axiolab HB50) ausgewertet. Die Vitalität der Zellen errechnete sich prozentual aus dem Verhältnis der toten Zellen zur Gesamtzellzahl.

3.2.3.3 Vitalität mit Fluoresceindiacetat/Trypanblau

Für diesen Vitalitätstest wurden Zellen bzw. Krypten mit FDA und Trypanblau versetzt. Vitale Zellen zeigten eine grüne Fluoreszenz (siehe Abschnitt 3.2.3.2), während tote Zellen blau angefärbt waren (siehe Abschnitt 3.2.3.1). Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden 40 µl der Zell- bzw. Kryptensuspension mit 10 µl der FDA-Gebrauchslösung und 50 µl Trypanblau vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Je 30 µl der Suspension wurden auf Super Frosted Slides gegeben und mit Deckgläschen verteilt. Bei 100-facher Vergrößerung wurden 100 Zellen bzw. 20 Krypten pro OT fluoreszenzmikroskopisch und im Durchlicht (Zeiss Axiolab HB50) ausgewertet. Die Vitalität der Zellen ergab sich prozentual aus dem Verhältnis der toten Zellen zur Gesamtzellzahl.

3.2.4 Bestimmung der Apoptose mit Annexin V-FITC

Das Verfahren zur Quantifizierung apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid beruht auf der asymmetrisch aufgebauten Plasmamembran vitaler Zellen. Diese Asymmetrie geht in apoptotischen Zellen verloren, so dass sich Phosphatidylserin, das unter normalen Bedingungen auf der zytoplasmatischen Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, vermehrt an der extrazellulären Membranseite befindet. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an dieses extrazelluläre Phosphatidylserin, so dass apoptotische Zellen durch fluoreszenzmarkiertes Annexin V fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden können. Die Unterscheidung zur Nekrose erfolgt dabei durch gleichzeitige Ausschlussfärbung mit Propidiumjodid, das durch die geschädigte Plasmamembran toter Zellen diffundiert und deren DNS anfärbt. Bei dieser Nachweismethode können vitale Zellen von frühapoptotischen, spätapoptotischen und nekrotischen Zellen anhand von vier verschiedenen Farbkombinationen unterschieden werden (Tabelle 1) [Koopman et al., 1994].

Tabelle 1: Farbkombinationen zur Unterscheidung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen.

beobachtete Färbung	Interpretation
farblos (Annexin negativ, Propidiumjodid negativ)	vitale Zelle
grün (Annexin positiv, Propidiumjodid negativ)	apoptotische Zelle
grün/rot (Annexin positiv, Propidiumjodid positiv)	spätapoptotische Zelle
rot (Annexin negativ, Propidiumjodid positiv)	nekrotische Zelle

Für den Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen in isolierten Kolonkrypten wurde der Annexin V-FITC-Apoptosis-Detection-Kit von Alexis (Alexis Corporation, Lausan, Schweiz) verwendet. 500 µl der Kryptsuspension wurden mit 10 µl Media Binding Reagenz und 1,25 µl Annexin V-FITC versetzt und 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Krypten wurden abzentrifugiert (8 min, 2000 rpm, RT) und das Pellet wurde in 600 µl kaltem 1 x Binding Buffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 10 µl Propidiumjodid gegeben, anschließend wurden die Krypten aliquotiert (3 x 200 µl) und abzentrifugiert (8 min, 2000 rpm, RT).

Die Pellets wurden jeweils in 50 µl Prolong-Antifade-Gebrauchslösung resuspendiert, die Suspensionen auf Super Frosted Slides gegeben und mit Deckgläschen verteilt. Zur Quantifizierung der apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden bei 100-facher Vergrößerung 20 Krypten je OT fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Zeiss Axiolab HB50).

3.2.5 Ansetzen der Testsubstanzen (H₂O₂, Hexenal und HNE)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden H₂O₂, Hexenal und HNE als DNS-schädigende Substanzen in den Versuchssystemen eingesetzt. H₂O₂ wurde in Konzentrationen zwischen 0 µM und 150 µM eingesetzt, wobei die Schädigung für 5 min bei 4 °C auf Eis erfolgte. Für Hexenal lag der Konzentrationsbereich zwischen 0 µM und 1600 µM und für HNE zwischen 0 µM und 250 µM. Bei diesen Testsubstanzen erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37 °C im Thermomixer. Der Ansatz der Testsubstanzen und die verwendeten Konzentrationen sind als Übersicht in Tabelle 2 aufgeführt (siehe Abschnitt 3.2.7.1).

3.2.6 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von HNE

Die Gewinnung des HNEs erfolgte durch Freisetzung aus HNE-Dimethylacetal. Die Konzentration des so hergestellten HNEs wurde photometrisch bestimmt. Die Gleichwertigkeit des gekauften und des aus HNE- Dimethylacetal isolierten HNEs wurde durch vergleichende Messungen im Comet-Assay getestet. Bei diesen Versuchen war kein Unterschied in der genotoxischen Wirkung der getesteten HNE-Lösungen festzustellen. Zur Freisetzung von HNE aus HNE-Dimethylacetal wurden 200 µl HNE-Dimethylacetal in einem Eppendorfftube mit 800 µl einer 1 mM Salzsäurelösung versetzt und 1 h bei RT gerührt. Das freigesetzte HNE wurde mit 2 ml Chloroform zweimal extrahiert. Die Chloroformfraktionen wurden vereinigt und zweimal mit 4 ml dd H₂O gewaschen. Das Chloroform wurde mit Natriumsulfat getrocknet, abpipettiert und mit Helium abgeblasen. Das HNE verblieb als viskoses gelbliches Öl im Tube und wurde im gewünschten Lösungsmittel (EtOH bzw. DMSO) aufgenommen.

Die Bestimmung der HNE-Konzentration erfolgte photometrisch nach Esterbauer et al. [1991]. Es wurde eine 100 %-ige Umsetzung des HNE- Dimethylacetal angenommen und die theoretisch vorliegende HNE-Konzentration berechnet. In einem Verdünnungsschritt wurde eine HNE-Konzentration von etwa 100 µM in dd H₂O bzw. EtOH hergestellt. Diese Verdünnungen wurden in Quarzküvetten pipettiert und die Extinktion der Lösungen bei 37 °C gegen das jeweilige Lösungsmittel gemessen [Protokoll von H. Esterbauer]. Aus dem Extinktionsmaximum bei 221 nm (H₂O) bzw. 223 nm (EtOH) ergab sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Einbeziehung des jeweiligen Verdünnungsfaktors die tatsächliche Konzentration der HNE-Stammlösung. Im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung wurde die Stammlösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt, in Kryotubes aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der in EtOH bzw. DMSO angesetzten HNE-Lösungen wurde in regelmäßigen

Abständen überprüft. Dabei zeigte sich, dass das HNE bei der gewählten Lagerungstemperatur stabil war.

3.2.7 Induktion und Reparatur von DNS-Schäden

3.2.7.1 Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge

Eine Übersicht über die verwendeten Testsubstanzen und die jeweiligen zur Induktion von DNS-Schäden verwendeten Inkubationsbedingungen ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2: Übersicht über die zur Erfassung von Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhängen eingesetzten Modellsubstanzen.

Modellsubstanz (Medium)	eingesetzte Konzentrationen	Inkubation	Reparatur	Lösungsmittel [µl/ml]
H ₂ O ₂ (PBS)	18,8 µM; 37,5 µM; 75 µM; 150 µM	5 min bei 4 °C	0 min	PBS [---]
Hexenal (RPMI)	400 µM; 800 µM; 1200 µM; 1600 µM	30 min bei 37 °C	0 min	DMSO [1 µl/ml]
HNE (RPMI)	100 µM; 150 µM; 200 µM; 250 µM	30 min bei 37 °C	0 min	DMSO [1 µl/ml] EtOH [< 25 µl/ml]

Zu Induktion von DNS-Schäden durch H₂O₂, Hexenal bzw. HNE im Tube wurden je 1 ml Zellsuspension (Zellzahl 2×10^6 Zellen/ml) in fünf Tubes gegeben (ein Tube für die Lösungsmittelkontrolle und vier Tubes für die Schädigung mit den verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen). Die Zellsuspensionen wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT) und die Überstände verworfen. Das Pellet der Kontrollzellen wurde in 1 ml Kontrollmedium resuspendiert und die übrigen Zellpellets in je 1 ml der angesetzten Gebrauchslösungen der Testsubstanzen resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen wurden die Tubes auf Eis gestellt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml RPMI in jeden Tube gegeben. Die Tubes wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT), die Überstände verworfen und die Zellpellets in RPMI resuspendiert (Zellzahl 2×10^6 Zellen/ml). Es wurden jeweils 20 µl Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit Trypanblau abgenommen und die Zellsuspensionen unverzüglich abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT). Die Überstände wurden verworfen und die Tubes mit den Zellpellets auf Eis gestellt.

Bei H₂O₂ kann die Inkubation der Zellen auch direkt auf dem OT erfolgen. Bei Hexenal und HNE ist dies nicht möglich, da diese Substanzen mit der Agarose reagieren und dadurch inaktiviert werden. Zur Induktion von DNS-Schäden durch H₂O₂ auf dem Objektträger wurde je 1 ml Zellsuspension (Zellzahl 2×10^6 Zellen/ml) in fünf Tubes gegeben und diese Tubes abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT). Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in je 1 ml 0,7 %-iger LMA (Low-melting Agarose) aufgenommen. Von diesen Agarose-Zellsuspensionen wurden je 75 µl auf die vorbereiteten Objektträger aufgebracht und anschließend eine vierte Agaroseschicht aus 75 µl LMA. Nach Festwerden der 4. Agaroseschicht wurden die OT auf einer Kühlbox angeordnet und nach Entfernen der Deckgläschen 50 µl PBS bzw. 50 µl der jeweiligen H₂O₂-Gebrauchslösung auf die OT aufgebracht und mit einem

Deckgläschen verteilt. Nach 5 min wurden die Deckgläschen entfernt, die OT gründlich in RPMI gespült und sofort in die Lyse gegeben. Die einzelnen OT wurden im 15-Sekundentakt behandelt.

Zur Induktion von DNS-Schäden durch H_2O_2 und HNE in 6-Well-Platten wurden die Platten mit den etwa 80 % konfluenten LT97-Zellen aus dem Brutschrank entnommen und die Zellen zur Kontrolle unter einem Mikroskop betrachtet. Anschließend wurde das Medium aus allen Wells mittels Aspirator abgenommen und die Zellen einmal mit 2 ml RPMI je Well gespült. Von der Lösungsmittelkontrolle und den Gebrauchslösungen wurden 2 ml je Well auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die 6-Well-Platte 5 min bei 4 °C auf Eis (H_2O_2 -Schädigung) bzw. 30 min bei 37 °C im Brutschrank (HNE-Schädigung) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 2 ml RPMI gestoppt und das Medium abgesaugt. Für die Ernte der Zellen wurden diese einmal mit 2 ml PBS/ Na_2EDTA gespült. Anschließend wurden 0,5 ml PBS/ Na_2EDTA je Well auf die Zellen geben und nach 2 min Inkubation bei 37 °C wieder abgesaugt. Es wurden 0,5 ml Trypsin/Versen je Well auf die Zellen gegeben und die 6-Well-Platten 4 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1,5 ml LT97-Komplettmedium pro Well abgestoppt. Die Zellen wurden im Medium resuspendiert und die Zellsuspensionen in 1,5 ml Eppendorfftubes überführt und abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT). Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen der für die Schädigung im Tube beschriebenen Vorgehensweise.

3.2.7.2 Reparaturversuche

Eine Übersicht über die im Rahmen der Reparaturversuche verwendeten Substanzkonzentrationen und die Reparaturdauer ist in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die bei den Reparaturversuchen eingesetzten Modellschadstoffe.

Modellschadstoff (Medium)	eingesetzte Konzentrationen	Inkubation	Reparatur	Lösungsmittel [µl/ml]
H_2O_2 (PBS)	150 µM	5 min bei 4 °C	0 min; 30 min; 60 min; 120 min	PBS [---]
Hexenal (RPMI)	400 µM	30 min bei 37 °C	0 min; 30 min; 60 min; 120 min	DMSO [1 µl/ml]
HNE (RPMI)	150 µM/200 µM	30 min bei 37 °C	0 min; 30 min; 60 min; 120 min	DMSO [1 µl/ml] EtOH [< 25 µl/ml]

Für die Reparatur der durch H_2O_2 , Hexenal bzw. HNE induzierten DNS-Schäden im Tube wurden je 2 ml Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) in zwei Tubes gegeben (ein Tube für die Lösungsmittelkontrolle und ein Tube für die Schädigung mit der jeweiligen Testsubstanz). Die Inkubation der Zellen mit den Testsubstanzen erfolgte wie in Abschnitt 3.2.7.1 beschrieben. Nach der Inkubation und dem Waschschrift wurden die Zellen auf jeweils vier Tubes aliquotiert. Zwei Tubes wurden abzentrifugiert (5 min, 2000 rpm, RT), die übrigen zur Reparatur bei 37°C weiter inkubiert. Die Zellen wurden in 750 µl 0,7 %-iger LMA aufgenommen und je 30 µl der Suspension auf vorbeschichtete OT aufgebracht (Doppelbelegung der OT). Eine 4.

Agaroseschicht aus 90 µl LMA wurde aufgebracht, danach wurden die OT in die Lyse gegeben. Mit den übrigen Zellen wurde nach 30 min, 60 min bzw. 120 min Reparatur entsprechend verfahren.

Für die Reparatur der durch H₂O₂ induzierten DNS-Schäden auf dem Objektträger erfolgte das Aufbringen der Zellen auf die OT und die Inkubation der Zellen mit H₂O₂ wie unter 3.2.7.1 beschrieben. Für die Reparaturversuche waren die OT doppelt belegt, wobei je OT zweimal 30 µl Zellsuspension aufgetragen wurden. Die vierte Agaroseschicht bestand aus 90 µl LMA. Nach Inkubation und Waschschrift wurden zwei der Kontroll-OT und zwei der H₂O₂-behandelten OT unverzüglich in die Lyse gegeben. Die übrigen OT wurden in Inkubationskammern bei 37 °C in den Brutschrank gestellt und nach 30 min, 60 min bzw. 120 min Reparatur in die Lyse gegeben.

3.2.8 Quantifizierung von Propano-dG-Addukten

Von Kooperationspartnern an der Universität Würzburg wurden im Rahmen dieser Arbeit die Propano-dG-Addukte in HNE-behandelten primären Kolonzellen bestimmt. Dazu wurde die DNS der Primärzellen mittels Festphasenextraktion aus den Zellen isoliert und UV-spektroskopisch quantifiziert. In dem sich anschließenden DNS-Verdau wurden 10 µg DNS mit Nukleasen in die Nukleotide (3'-Monophosphate) hydrolysiert. Das DNS-Hydrolysat wurde mit NukleaseP1 behandelt, um die vorliegenden Nukleotide zu Nukleosiden zu dephosphorylieren, während speziell die Propano-Addukte des HNEs nicht angegriffen wurden. Durch diesen Schritt wurde eine Anreicherung der Addukte erreicht, die im Folgenden mit Kinase und ³²P-ATP zu den 3'-P5'-³²P-Bisphosphaten umgewandelt wurden. Die ³²P-markierten Addukte wurden chromatographisch aufgetrennt und die Chromatogramme in einem Instant-Imager ausgezählt. Die Quantifizierung der Propano-Addukte erfolgte durch Aufspiken von Adduktstandards zu einzelnen Proben. Die Vergleichbarkeit der Messungen wurde durch interne Standards, wie Propano-dG-Addukte des Hexenals, überwacht. Für detailliertere Informationen muss an dieser Stelle auf die Publikationen der Kooperationspartner verwiesen werden [Wacker et al., 2000; Wacker et al., 2002].

3.2.9 Genotoxizitätstests

In Tabelle 4 ist eine Übersicht über die im Rahmen der Genotoxizitätstests (Comet-Assay und Comet-FISH) durchgeführten Versuche gegeben.

Tabelle 4: Übersicht über die durchgeführten Comet-Assay- und Comet-FISH-Versuche.

Zellen	Modellsubstanz (Medium)	Versuch	Tube	Objekt-träger	6-Well-Platte	FISH
HT29clone19a-Kolonzellen	H ₂ O ₂ (PBS)	Konz.-Wirk.-Zus.	X	X		
		Reparatur	X	X		
	Hexenal (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.	X			
		Reparatur	X			
	HNE (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.	X			
		Reparatur	X			
Primäre Kolonzellen	H ₂ O ₂ (PBS)	Konz.-Wirk.-Zus.	X	X		X
		Reparatur	X	X		
	Hexenal (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.	X			X
		Reparatur	X			
	HNE (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.	X			X
		Reparatur	X			
LT97-Kolonzellen	H ₂ O ₂ (PBS)	Konz.-Wirk.-Zus.	X		X	X
		Reparatur	X			
	Hexenal (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.				X
		Reparatur				
	HNE (RPMI)	Konz.-Wirk.-Zus.	X		X	X
		Reparatur	X			

3.2.9.1 Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay

Die genotoxische Wirkung der Testsubstanzen auf die Zellen wurde mit Hilfe der Einzelzellgelelektrophorese nachgewiesen. Diese Methode, allgemein als Comet-Assay bezeichnet, ist eine schnelle, einfache und sensitive Methode zur Messung von DNS-Schäden in einzelnen Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die alkalische und die neutrale Version des Comet-Assays verwendet, wobei der Versuchsablauf identisch war und der pH-Wert des Elektrophoresepuffers den einzigen Unterschied darstellte. Wird die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen (pH-Wert des Elektrophoresepuffers > 13) durchgeführt, werden DNS-Doppelstrangbrüche, DNS-Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, Exzisionsreparaturstellen und DNS-Crosslinks mit hoher Sensitivität erfasst. Hingegen werden im neutralen Comet-Assay (pH-Wert des Elektrophoresepuffers = 8) ausschließlich DNS-Doppelstrangbrüche und Crosslinks detektiert [Tice et al., 2000; Collins, 2002].

Einen Tag vor Versuchsdurchführung erfolgte die Vorbeschichtung der einseitig aufgerauhten Objektträger mit 0,5 %-iger Normal Melting Agarose (NMA). Die erste Schicht diente der glatten und festen Anheftung der zweiten und dritten, zellführenden Agaroseschicht. Für die erste Schicht wurden 50 µl Agarose mit einem zweiten OT gleichmäßig verstrichen und die OT bei 60 °C getrocknet. Eine zweite Schicht aus 85 µl NMA (Normal-melting Agarose) wurde aufgebracht und mit einem Deckgläschen verteilt. Diese Agaroseschicht war nach 10 min bei 4 °C fest und die OT wurden bis zu ihrer Verwendung in einer mit einem feuchten Tuch ausgelegten Box im Kühlschrank aufbewahrt.

Alle Arbeiten des Comet-Assays wurden in abgedunkelten Räumen unter Rotlicht durchgeführt, um DNS-Schäden als Folge der Einwirkung von UV-Licht zu vermeiden. Die Zellpellets wurden in 0,7 %-iger LMA aufgenommen und resuspendiert. Bei Einfachbelegung (eine Probe je OT) wurden 75 µl dieser Zellsuspension auf die vorbeschichteten OT aufgebracht und mit einem Deckgläschen (70 x 24 mm) verteilt. Bei Doppelbelegung (zwei Proben je OT) wurden 30 µl der Zellsuspension aufgetragen und mit kleinen Deckgläschen (24 x 24 mm) verteilt. Die Objektträger wurden bis zum Erstarren der Agarose auf einer Eisbox gelagert, bevor eine abschließende vierte Agaroseschicht (75 µl bzw. 90 µl LMA) auf den gesamten Objektträger aufgebracht und 10 min bei 4 °C gekühlt wurde. Nach Erstarren der Agarose, wurden die Deckgläschen entfernt, und die OT für mindestens eine Stunde bei 4 °C in Lyselösung (pH = 10) gestellt. Detergenzien und Salze in hoher Konzentration führten dabei zu einer Permeabilisierung der Zellmembranen und zur Ausfällung der zytoplasmatischen und nukleären Proteine. Im Anschluss an die Lyse wurden die Objektträger mit Elektrophoresepuffer gespült und in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten horizontalen Elektrophoreseapparatur angeordnet. Beim alkalischen Elektrophoresepuffer bewirkt die 20-minütige Einwirkzeit eine vollständige Denaturierung und Entwindung der DNS-Doppelhelix. Vorhandene Brüche in den nun einzelsträngig vorliegenden DNS-Molekülen führen zu einer Aufhebung der dicht gepackten DNS-Struktur (Supercoiling) und zu einer Relaxation des DNS-Moleküls, verbunden mit der Freisetzung von DNS-Fragmenten aus der Kernmatrix [McKelvey-Martin et al., 1993]. Bei der sich anschließenden Elektrophorese (20 min; 1,25 V/cm; 300 mA) wandern die negativ geladenen DNS-Bruchstücke im Agarosegel in Richtung Anode. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger der Apparatur entnommen, auf Färbewannen gelegt und 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer (pH = 7,5) gewaschen. Nach Abtropfen wurden die Gele mit 50 µl Ethidiumbromid- bzw. 30 µl SYBRGreen-Gebrauchslösung angefärbt. Die mit Deckgläschen abgedeckten Objektträger wurden bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in einer feuchtgehaltenen Box bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Bis Januar 2001 wurden die Zellen für die Comet-Assay-Auswertung mit Ethidiumbromid angefärbt. Seitdem wurde das Arbeiten mit diesem hochgradig karzinogenen DNS-Farbstoff vollständig eingestellt und stattdessen SYBRGreen verwendet. Das SYBRGreen wurde in einem selbst hergestellten Antifade auf DABCO-Glycerol-Basis auf Gebrauchskonzentration verdünnt [Ono et al., 2001]. Der Wechsel des Fluoreszenzfarbstoffes hatte keine Auswirkung auf die im Comet-Assay erhaltenen Ergebnisse. Die Auswertung der Ethidiumbromid- bzw. SYBRGreen-gefärbten Zellen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert HB50) bei 400-facher Vergrößerung. Zur Quantifizierung der DNS-Schäden wurde bis Dezember 2000 das Bildauswertungssystem COMET-ASSAY II 1.03 von Perceptive Instruments (Halstead, UK) genutzt. Ab Januar 2001 wurden die Versuche mit der KOMET 4.0-Software von Kinetic

Imaging Ltd. (Liverpool, UK) ausgewertet. Eine mit beiden Systemen durchgeführte doppelte Auswertung von Versuchen zeigte, dass der Wechsel des Auswertungssystems keine Auswirkung auf die im Comet-Assay erhaltenen Ergebnisse hatte. Je Objektträgerbelegung wurden 50 Zellen ausgewertet, wobei die Tail Intensity (TI [%]) als Parameter für die DNS-Schädigung verwendet wurde. Die Tail Intensity gibt den auf die Gesamt-DNS bezogenen prozentualen Anteil der DNS im Kometenschweif an. Die Agarosegele wurden in der Regel innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Anfärbung ausgewertet.

3.2.9.2 Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH

Bei den Comet-FISH-Versuchen entsprachen die Arbeitsschritte des Comet-Assays weitgehend denen des alkalischen Comet-Assays, wie sie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben sind. Allerdings wurde für die Comet-FISH-Versuche eine andere Agaroseschichtdicke auf den OT verwendet. So bestand die zweite Agaroseschicht nicht aus 85 µl, sondern aus 200 µl 0,5 %-iger NMA. Durch diese dickere Agaroseschicht wurde die Hintergrundfluoreszenz minimiert, die die Auswertung der Comet-FISH-Versuche gestört hätte. Die zellführende Schicht wurde hingegen dünner gewählt (50 µl) und auf eine vierte Agaroseschicht vollkommen verzichtet. Dadurch lagen die Zellen an der Oberfläche der Agarosegele und die für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendeten Sonden mussten nicht so weite Strecken durch die Agarose diffundieren, um mit der jeweiligen Zielsequenz in den Zellen zu hybridisieren. Zudem wurden bei der Auswertung der FISH-Versuche die Fluoreszenzsignale der Sonden nicht durch eine darüber liegende Agaroseschicht gestreut und abgeschwächt. Der Einfluss der geänderten Objektträgerbeschichtung auf die im Comet-Assay quantifizierten DNS-Schäden wurde in H₂O₂-geschädigten HT29clone19a-Zellen untersucht (n = 2). Die Veränderung der Agaroseschichtdicken hatte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen DNS-Schadensraten.

Bei den Comet-FISH-Versuchen wurden die OT nach der Elektrophorese ebenfalls neutralisiert. Zur Quantifizierung der generellen DNS-Schäden wurden aber nur zehn OT angefärbt und mittels Comet-Assay ausgewertet. Die übrigen zehn OT wurden für die sich anschließenden FISH-Versuche in 100 %-igem EtOH dehydriert und aufbewahrt. Die Auswertung der durch die Testsubstanzen induzierten Schäden an der gesamten DNS erfolgte wie in Abschnitt 3.2.9.1 beschrieben mittels Comet-Assay. Für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurden die dehydrierten OT aus dem Comet-Assay zum Rehydrieren für 10 min in dd H₂O gestellt. Anschließend wurde die DNS der Zellen in 0,5 M Natriumhydroxidlösung für 30 min denaturiert. Die Gele wurden neutralisiert (PBS, 1 min) und in einer ansteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 % und 95 % EtOH, jeweils für 5 min) wieder dehydriert. Die OT wurden bei RT getrocknet und mit jeweils 30 µl Hybrisol VI benetzt. Die denaturierte Hybridisierungsprobe wurde aufgetragen und mit einem Plastikdeckgläschen (24 x 24 mm) verteilt. Zur Überprüfung

der Hybridisierung wurde auf jedem OT gleichzeitig eine Negativkontrolle (15 µl Hybrisol VI; 24 x 24 mm Plastikdeckgläschen) aufgebracht. Die OT wurden in Hybridisierungskammern gegeben und diese 24-72 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die OT 5 min in 2 x SSC (Saline Sodium Citrate) bei 72 °C und für 5 min in 1 x PBD (Phosphatdetergenz) bei RT gewaschen. Die weitere Vorgehensweise unter Verwendung dig- bzw. direktmarkierter Sonden wird im Folgenden beschrieben.

Arbeiten mit dig-markierten Sonden

Die gekaufte dig-markierte *TP53*-Sonde wurde 30 min bei 37 °C im Thermomixer denaturiert. Je OT wurden 10 µl Probe mit 20 µl Hybrisol VI gemischt, auf die OT aufgetragen und mit einem kleinen Plastikdeckgläschen (24 x 24 mm) verteilt. Die dig-markierten Sonden für das *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen (Humangenetik) wurden denaturiert, indem sie 5 min bei 72 °C, anschließend 2 min bei 4 °C auf Eis und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Je OT wurden 5 µl der DNS-Sonde mit 10 µl Hybrisol VI gemischt und auf die OT aufgetragen. Die Detektion der dig-markierten Sonden erfolgte nach enzymatischer Signalverstärkung mit dem „Anti-Digoxigenin-AP-Fab-Fragmente und HNPP-Fluorescence-Detection-Kit“ (Boehringer Mannheim). Die einzelnen Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zum Schluss wurde die Gesamt-DNS mit 30 µl SYBRGreen je OT gegengefärbt und die OT bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung im Kühlschrank (4 °C) lichtgeschützt aufbewahrt.

Arbeiten mit direktmarkierten Sonden

Die direktmarkierten Sonden für das *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen (Humangenetik) wurden denaturiert, indem sie 5 min bei 72 °C, anschließend 2 min bei 4 °C auf Eis und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert wurden. Je OT wurden 5 µl der DNS-Sonde mit 10 µl Hybrisol VI gemischt und auf die OT aufgetragen. Bei Arbeiten mit FITC-markierten Sonden wurde die Gesamt-DNS mit 30 µl Ethidiumbromid-Gebrauchslösung je OT gegengefärbt. Bei Arbeiten mit den TexasRed-markierten Sonden kamen 30 µl SYBRGreen-Gebrauchslösung je OT zum Einsatz. Der Farbstoff wurde jeweils mit Glasdeckgläschen verteilt und die OT bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in einer feucht gehaltenen Box bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Die Comet-FISH-Experimente wurden ausgewertet, indem als erstes die Gesamtzahl der Fluoreszenzsignale in der jeweiligen Zelle bestimmt wurde. Bei diploidem Chromosomensatz sind in einem Interphasenkern zwei Signale zu erwarten. Es wurde die Zahl der Zellen ohne, mit nur einem, mit zwei oder mehr Signalen gezählt und die Hybridisierungseffizienz des jeweiligen Versuches bestimmt. Ferner wurden die ausgewerteten Zellen vier Schädigungskategorien zugeordnet, wobei 1 für ungeschädigt und 4 für stark geschädigt stand [Collins, 2002]. In den einzelnen Zellen wurde die Lokalisierung der Hybridisierungssignale ausgewertet und festgehalten, ob sich die Signale im Kometenkopf oder im Kometenschweif befanden. Auch auf

vorliegende gebrochene Signale wurde geachtet und die Häufigkeit ihres Auftretens notiert. Je OT wurden, in Abhängigkeit von der Zahl der Zellen auf den OT und von der jeweiligen Hybridisierungseffizienz, 100 bis 150 Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (Zeiss Axiovert 100). Die einzelnen Versuche wurden drei- bis viermal wiederholt.

Zwei-Farben-FISH- und Drei-Farben-FISH-Versuche

Bei den Zwei- und Drei-Farben-FISH-Versuchen wurde mit direktmarkierten DNS-Sonden für das *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen gearbeitet. Die Sonden wurden 5 min bei 72 °C denaturiert, anschließend 2 min bei 4 °C auf Eis gestellt und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Für einen OT wurden 15 µl Hybridisierungsprobe (5 µl DNS-Sonde und 10 µl Hybrisol VI) je Gen aufgetragen. Für den Zwei-Farben-FISH wurden also 15 µl einer FITC-markierten DNS-Sonde und 15 µl einer TexasRed-markierten DNS-Sonde aufgetragen. Für den Drei-Farben-FISH wurden für jedes Gen 15 µl Hybridisierungsprobe aufgetragen, 15 µl einer FITC-markierten Sonde, 15 µl einer TexasRed-markierten Sonde und 15 µl einer gemischten FITC-TexasRed-markierten Sonde. Bei den Zwei-Farben- und Drei-Farben-FISH-Versuchen wurde die Gesamt-DNS mit 50 µl DAPI-Gebrauchslösung je OT gegengefärbt. Der Farbstoff wurde jeweils mit Glasdeckgläschen verteilt und die OT bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in einer dunklen Box bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Zwei- und Drei-Farben-FISH-Experimente wurden ausgewertet, indem zuerst die Gesamtzahl der Fluoreszenzsignale in der jeweiligen Zelle bestimmt wurde. In einem normalen Interphasenkern sollten zwei Hybridisierungssignale je Gen gefunden werden, als zwei grüne, zwei rote und beim Drei-Farben-FISH zusätzlich zwei rot-grüne Signale. Die Zellen wurden fotografiert, um das Funktionieren der Versuche zu dokumentieren. Von einer weitergehenden, quantitativen Auswertung wurde abgesehen, da nur in sehr wenigen Zellen alle erwarteten Signale gefunden wurden.

Versuche mit Ganzchromosomenproben und genspezifischen Sonden

Für diese Versuche wurde eine grün fluoreszierende Ganzchromosomenprobe für Chromosom 17 mit der dazugehörigen rot markierten *TP53*-Sonde für die Hybridisierung verwendet. Die Sonden wurden nach Herstellerangaben für 30 min bei 37 °C denaturiert. Je OT wurden 30 µl der Ganzchromosomenprobe und 30 µl der Gensonde (jeweils 10 µl der Sonde und 20 µl Hybrisol VI) aufgetragen. Die Hybridisierungsdauer betrug 72 h. Die Gesamt-DNS wurde mit 50 µl DAPI-Gebrauchslösung je OT gegengefärbt. Der Farbstoff wurde jeweils mit Glasdeckgläschen verteilt und die OT bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung in einer feuchtgehaltenen Box bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Die Versuche wurden ausgewertet, indem zuerst die Zahl der *TP53*-Signale in der jeweiligen Zelle bestimmt wurde. Die beiden rot fluoreszierenden Hybridisierungssignale lagen vor dem grün fluoreszierenden, diffusen Signal

der Gesamtchromosomenprobe. Die OT wurden nicht quantitativ ausgewertet, da sich die Lage der *TP53*-Signale zu Chromosom 17 und zur Gesamt-DNS nicht aufeinander beziehen ließ.

3.2.10 Karyotypisierung der HT29clone19a- und LT97-Zellen mittels 24-Farben-FISH

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl für die HT29clone19a-Zellen als auch für die LT97-Kolonadenomzellen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. U. Claussen (Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) der Karyotyp bestimmt und publiziert [Kuechler et al., 2003; Schaeferhenrich et al., 2003b]. Die Metaphasen der HT29clone19a- und LT97-Zellen wurde nach Standardprotokollen für 24-Farben-FISH präpariert. Die OT wurden mit RNase vorbehandelt um den Plasmahintergrund zu vermindern [Liehr et al., 1995]. Die weiteren Schritte der 24-Farben-FISH-Versuche wurden wie bei Yu et al. [2001] beschrieben durchgeführt. Ganzchromosomenproben für alle menschlichen Chromosomen wurden durch Mikrodissektion gewonnen und nach Standardprotokoll mittels DOP-PCR (degenerate oligonucleotid primer-PCR) mit fünf unterschiedlichen Fluorochromen bzw. Liganden markiert (R110, TexasRed, SpectrumOrange, Biotin und Digoxigenin) [Senger et al., 1997]. Nach 72-stündiger Hybridisierung bei 37 °C und nachfolgenden Waschschritten (3 x 5 min in 50 % Formamid/2 x SSC bei 45 °C und 3 x 5 min in 2 x SSC bei 37 °C) wurden die biotin- bzw. dig-markierten Sonden mit Cy5-Avidin bzw. anti-Digoxigenin-Cy5.5 (Amersham, Buckinghamshire, UK) detektiert. Die 24-Farben-FISH-OT wurden mit DAPI gegengefärbt.

Die Auswertung der OT wurde an einem Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop (ZEISS, Jena) unter Verwendung der ISIS3- und IKAROS-Bildauswertungssoftware (MetaSystems, Altlußheim) vorgenommen. Es wurden 10 (HT29clone19a-Zellen) bzw. 18 (LT97-Zellen) Metaphasen ausgewertet. Die Bruchpunktcharakterisierung der aberranten Chromosomen wurde mittels Multi-Colour-Banding nach Liehr et al. [2002] durchgeführt.

3.2.11 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde die GraphPadPrism Software (Version 4.0) verwendet. Die Ergebnisse unabhängiger Versuche wurden gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben, wobei für die Genotoxizitäts- und Reparaturversuche mittels Comet-Assay die Mittelwerte aus 3-4 parallel gemessenen OT je Versuch in die statistische Auswertung eingingen. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mittels One-way- oder Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest. Als statistisch signifikant wurden Analysen mit $p < 0,05$ bewertet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4 ERGEBNISSE

4.1 Aufarbeitung, Aufbewahrung und Aufreinigung humaner Kolongewebeproben

Während in den ersten Monaten der praktischen Arbeiten Kolonbiopsien aus der Klinik für Innere Medizin (KIM) der Friedrich-Schiller-Universität Jena verwendet wurden, kamen ab Mai 2000 ausschließlich Kolongewebeproben aus der Allgemeinen und Viszeralen Chirurgie des Klinikums Bachstraße zur Aufarbeitung. Die Verwendung von Kolongewebe anstelle von Kolonbiopsien hatte den Vorteil, dass mehr Zellmaterial für Versuche zur Verfügung stand. Die Aufarbeitung des Probenmaterials unterschied sich von der des Biopsiematerials und wurde im Rahmen dieser Arbeit als Methode neu ausgearbeitet und optimiert.

Die isolierten epithelialen Kolonzellen und Kolonkrypten wurden für Untersuchungen in den verschiedenen Testsystemen verwendet.

4.1.1 Aufarbeitung von Kolonbiopsien und Kolongewebe

4.1.1.1 Kolonbiopsien

Insgesamt wurde Biopsiematerial von 18 Patienten aufgearbeitet, das durchschnittlich aus $4,1 \pm 0,9$ Biopsien bestand. Zu allen Proben wurden ausgefüllte Patientendatenblätter mitgeliefert, deren Auswertung im Anhang II tabellarisch dargestellt ist (Tabelle 14). Eine Angabe der Diagnose erfolgte nicht. Die Auswertung ergab, dass Kolonbiopsien von 13 Patientinnen und 8 Patienten entnommen wurden. Unter den Patienten befand sich ein Raucher (5,9 %; $n = 17$), in einem Fall wurde zum Rauchverhalten keine Angabe gemacht. Das Durchschnittsalter lag bei $59,5 \pm 14,9$ Jahren ($n = 18$) und der Body Mass Index betrug $27,4 \pm 4,6 \text{ kg/m}^2$ ($n = 14$).

4.1.1.1.1 Gewinnung von Kolonkrypten

Bei acht Biopsieproben wurde der Enzymverdau nach etwa 30 min gestoppt, um mikroskopisch die Anzahl und Vitalität der Krypten bestimmen zu können. Bei fünf dieser Proben konnten auswertbare Krypten isoliert werden. Die Vitalität der erhaltenen Kolonkrypten wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Es wurden $7,7 \pm 2,4$ tote Zellen je Krypte gezählt, was bei einer durchschnittlichen Zellzahl von etwa 250 Zellen/Krypte [Potten und Loeffler, 1990] einer Vitalität von $97,0 \pm 1,0 \%$ entspricht. Die toten Zellen lagen stets am oberen Rand der Krypte, wo diese aus der Epithelschicht „herausgebrochen“ war.

4.1.1.1.2 Gewinnung von primären Kolonzellen

Bei der Aufarbeitung des Biopsiematerials wurden nach 60 min Enzymverdau durchschnittlich $2,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ Zellen gewonnen ($n = 11$). Bezogen auf die durchschnittliche Probengröße ($4,1 \pm 0,9$ Biopsien), wurden somit im Schnitt etwa $0,68 \times 10^6$ Zellen je Biopsie erhalten. Die

Vitalität der aus dem Biopsiematerial isolierten Primärzellen wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt und lag bei $90,0 \pm 3,8 \%$ ($n = 11$). Die DNS-Basisschadensrate wurde im Comet-Assay bestimmt und betrug $7,0 \pm 3,1 \%$ (TI; $n = 11$).

4.1.1.2 Kolongewebe

Seit Anfang Mai 2000 wurden insgesamt 71 Gewebeproben aufgearbeitet. Zu 43 der Proben wurden ausgefüllte Patientendatenblätter mitgeliefert, deren Auswertung im Anhang II tabellarisch zusammengefasst ist (Tabelle 15). Gemäß Tabelle 15 wurden 23 Patientinnen und 20 Patienten operiert, wobei die Operationsindikationen Karzinome (Sigma-, Rektum-, Zäkum- bzw. Kolonkarzinom), Divertikulitis oder Kolonpolypen waren. In einigen Fällen erfolgte keine Angabe der Diagnose. Unter den Patienten befanden sich drei Raucher (7,9 %; $n = 38$), bei fünf Patienten wurde zum Rauchverhalten keine Angabe gemacht. Das Durchschnittsalter lag bei $61,8 \pm 13,0$ Jahren ($n = 42$) und der Body Mass Index betrug $26,0 \pm 3,8 \text{ kg/m}^2$ ($n = 37$).

4.1.1.2.1 Gewinnung von Kolonepithelstreifen

Bei der Aufarbeitung des Gewebes wurde die Größe der abgetrennten Epithelschicht abgeschätzt und das Gewicht der Epithelstreifen bestimmt. Die Größe des Kolonepithels variierte zwischen 2 und 25 cm^2 und lag durchschnittlich bei $10,5 \pm 5,6 \text{ cm}^2$ ($n = 28$). Das durchschnittliche Gewicht lag bei $1,1 \pm 0,6 \text{ g}$ ($n = 28$).

4.1.1.2.2 Gewinnung von Kolonkrypten

Bei sechs Gewebeproben wurde der Enzymverdau nach etwa 45-60 min gestoppt um Suspensionen mit Kolonkrypten zu erhalten. Dabei wurden jeweils auswertbare Krypten gewonnen, deren Anzahl und Vitalität bestimmt wurde. Die Zahl der isolierten Krypten lag pro Gramm Kolonepithel bei etwa 75.000 Krypten ($n = 3$). Die mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmte Vitalität lag bei $95,0 \pm 1,0 \%$ ($n=6$). Die toten Zellen lagen wiederum am oberen Rand der Krypte. Der stets von oben nach unten verlaufende Zerfall der Krypten setzte bei RT etwa 4 h nach ihrer Isolation ein und war nach etwa 12-16 h vollständig, so dass nur noch Zellaggregate und vereinzelte Zellen vorlagen. Die Auflockerung der Kryptenstruktur als ein erstes Zeichen des einsetzenden Zerfalls ist in Abbildung 11 dargestellt.

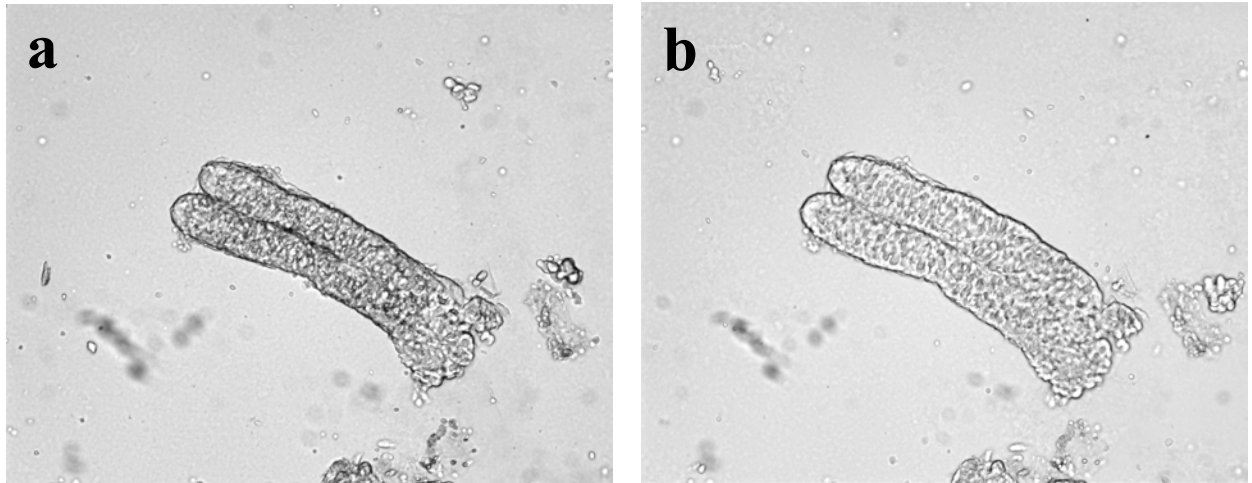


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Kolonkrypten a) direkt nach der Isolierung und b) nach 6 h bei Raumtemperatur.

Aufnahme der Krypten in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera.

4.1.1.2.3 Gewinnung von primären Kolonzellen

Durch enzymatische Aufarbeitung der Gewebeproben wurden durchschnittlich $48,6 \times 10^6 \pm 40,8 \times 10^6$ Zellen gewonnen ($n = 55$). Dabei betrug die Zeit des Enzymverdaus 30-120 min. Bezieht man die Menge der isolierten Zellen auf die Probengröße, so wurden durchschnittlich $4,63 \times 10^6$ Zellen je cm^2 Kolonepithel bzw. $45,6 \times 10^6$ Zellen je g Kolonepithel gewonnen. Die mit Trypanblau-Ausschlusstest bestimmte Vitalität der isolierten Primärzellen lag bei $89,1 \pm 5,3 \%$ ($n = 77$) und die im Comet-Assay bestimmte DNS-Basisschadensrate bei $6,7 \pm 2,6 \%$ (TI; $n = 55$).

4.1.1.3 Vergleich der Aufarbeitung von Kolonbiopsien und Kolongewebe

Eine vergleichende Gegenüberstellung von Kolonbiopsie- und Kolongewebeaufarbeitung bietet die Tabelle 5. Aus dieser geht hervor, dass sowohl hinsichtlich der Zellvitalität als auch der Basisschadensrate keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den aus Biopsiematerial bzw. aus Kolongewebe isolierten Zellen nachzuweisen waren.

Tabelle 5: Vergleichende Gegenüberstellung von Kolonbiopsie- und Kolongewebeaufarbeitung.

Auswertungsparameter	Kolonbiopsien	Kolongewebe
Anzahl der aufgearbeitete Proben	18	71
Geschlecht (Frauen/ Männer [%])	77,8/ 22,2	53,5/ 46,5
Durchschnittsalter [a]	$59,5 \pm 14,9$	$61,8 \pm 13,0$
BMI [kg/m^2]	$27,4 \pm 4,6$	$26,0 \pm 3,8$
Raucher [%]/ Nichtraucher [%]	5,9/ 94,1	7,9/ 92,1
Probengröße [Anzahl] bzw. [g]	$4,1 \pm 0,9$	$1,1 \pm 0,6$
Zellzahl je Probe	$2,8 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$	$48,6 \times 10^6 \pm 40,8 \times 10^6$
Zellzahl/Biopsie bzw. /g Epithel	$0,68 \times 10^6$	$45,6 \pm 38,3$
Zellvitalität [%]	$90,0 \pm 3,8$	$89,1 \pm 5,3$
Tail Intensity [%]	$7,0 \pm 3,1$	$6,7 \pm 2,6$
Kryptzahl/Biopsie bzw. /g Epithel	n.d.	$7,5 \times 10^4$
Kryptvitalität [%]	$97,0 \pm 1,0$	$95,0 \pm 1,0$

4.1.2 Aufbewahrung von Primärmaterial

Um die Versuchsplanung flexibler gestalten zu können, wurden Möglichkeiten der kurzfristigen und langfristigen Aufbewahrung primärer Kolonzellen, -krypten und -epithelstreifen getestet.

So wurde u.a. die kurzfristige Aufbewahrung über Nacht bei 4 °C in HBSS untersucht, wie auch das Einfrieren des Materials bei -130 °C, wobei jeweils der Einfluss der Gewebeaufbewahrung auf Zellvitalität und Basisschadensrate ermittelt wurde.

4.1.2.1 Kurzfristige Aufbewahrung

4.1.2.1.1 Aufbewahrung von primären Kolonzellen

Die kurzfristige Aufbewahrung der frisch isolierten primären Kolonzellen über Nacht bei 4°C in HBSS stellte keine gangbare Alternative zur direkten Zellisolierung dar. So sank die Vitalität der Zellen signifikant von $89,2 \% \pm 4,4 \%$ auf $73,4 \% \pm 7,5 \%$ ($n = 4$) und die als Tail Intensity im Comet-Assay gemessene DNS-Basisschadensrate stieg von $8,1 \pm 3,3 \%$ auf $13,6 \% \pm 3,1 \%$ ($n = 3$) an, wobei dieser Anstieg nicht signifikant war.

4.1.2.1.2 Aufbewahrung von Kolonkrypten

Auch für die kurzfristige Aufbewahrung von frisch isolierten Kolonkrypten hat sich die Lagerung über Nacht bei 4° C in HBSS nicht bewährt, weil ein Großteil der Krypten in Bruchstücke und einzelne Zellen zerfiel. Nach Trypanblaufärbung zeigte sich eine starke Zunahme der toten Zellen, wobei die Berechnung der Vitalität in den Bruchstücken nicht möglich war.

4.1.2.1.3 Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen

Die kurzfristige Aufbewahrung der Epithelstreifen hat sich hingegen bewährt, da sie sich nicht entscheidend auf Zellvitalität oder DNS-Basisschadensrate auswirkte. Hierbei wurden die vom Kolongewebe abgetrennten Epithelstreifen über Nacht bei 4° C in HBSS aufbewahrt und erst am nächsten Morgen zerkleinert und enzymatisch verdaut. Bei diesem Verfahren waren die Zellvitalitäten zu beiden Aufarbeitungszeitpunkten gleichbleibend gut und lagen nach 120 min Enzymverdau bei $91,4 \pm 4,1 \%$ bzw. bei $92,5 \pm 2,6 \%$ ($n = 7$; direkter Vergleich). Auch die Basisschadensraten unterschieden sich nicht voneinander, wie ein Vergleich der TI-Werte zeigt. So betrug der TI-Wert bei Isolierung der Zellen am Tag der Gewebeentnahme $8,5 \pm 2,6 \%$ und bei Isolierung am Folgetag $8,3 \pm 2,1 \%$ ($n = 7$; direkter Vergleich).

4.1.2.2 Langfristige Aufbewahrung

4.1.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von primären Kolonzellen

Aus Biopsiematerial isolierte Kolonzellen wurden nach 60 min Enzymverdau mit Erythrozytenlysepuffer behandelt und danach mit 6×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium 1 (59 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO und 1 % PenStrep) eingefroren. Dabei sank die Vitalität, die

nach 60 min Enzymverdau bei $90,7 \pm 1,4$ % lag, nach Erythrozytenlyse auf $70,5 \pm 22,8$ % ($n = 2$). Dieser Vitalitätsverlust ist wegen der großen Standardabweichung von 22,8 % jedoch nicht signifikant. Nach dem Auftauen zeigten die Zellen eine signifikant verringerte Vitalität von nur $11,3 \pm 0,8$ % ($n = 2$, jeweils 5 Tubes). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden im Weiteren Zellen nach 60 min Enzymverdau ohne Erythrozytenlyse mit einer Ausgangsvitalität von $87,3 \pm 8,3$ % eingefroren ($n = 2$, jeweils 5 Tubes). Nach dem Auftauen zeigten diese eine auf $69,4 \pm 0,7$ % verringerte Vitalität ($n = 9$), wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war (Abbildung 12).

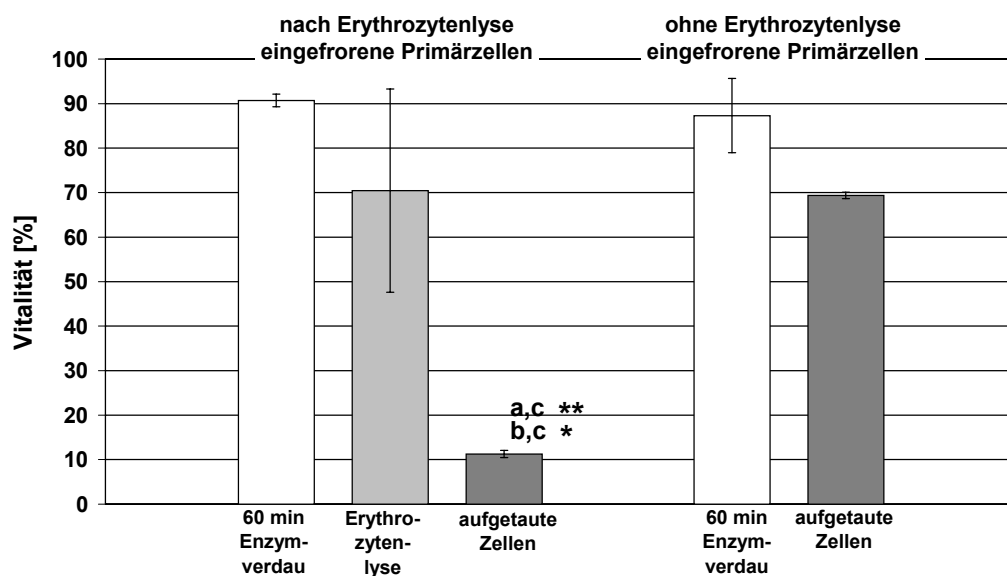


Abbildung 12: Vitalität eingefrorener und wieder aufgetauter Primärzellen nach Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Wiederauftauen.

Angaben als MW \pm SD. a,c **: signifikanter Unterschied in den nach Erythrozytenlyse eingefrorenen Primärzellen zwischen den Zellen nach 60 min Enzymverdau und den aufgetauten Zellen; b,c *: signifikanter Unterschied in den nach Erythrozytenlyse eingefrorenen Primärzellen zwischen den Zellen nach Erythrozytenlyse und den aufgetauten Zellen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Vitalität der aufgetauten Zellen lag, unabhängig davon, ob sie vor dem Einfrieren einer Erythrozytenlyse unterworfen worden waren, unter der für Versuche erforderlichen Vitalität von mindestens 80 %. Insofern stellte das Einfrieren von isolierten Kolonprimärzellen keine geeignete Aufbewahrungsmethode dar.

4.1.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Kolonepithelstreifen

Von den Kolonepithelstreifen wurden 4-5/ml Einfriermedium 1 (59 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO und 1 % PenStrep) bzw. Einfriermedium 2 (59 % DMEM, 30 % FCS, 10 % DMSO und 1 % PenStrep) eingefroren. Die eingefrorenen Epithelstreifen wurden aufgetaut, gewaschen, mechanisch zerkleinert und 30 min bzw. 60 min enzymatisch verdaut. Zur Entfernung der Erythrozyten wurden die Zellpellets mit Erythrozytenlysepuffer behandelt und die Zellsuspension anschließend durch Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt ($n = 4$; für die Dichtegradientenzentrifugation $n = 3$).

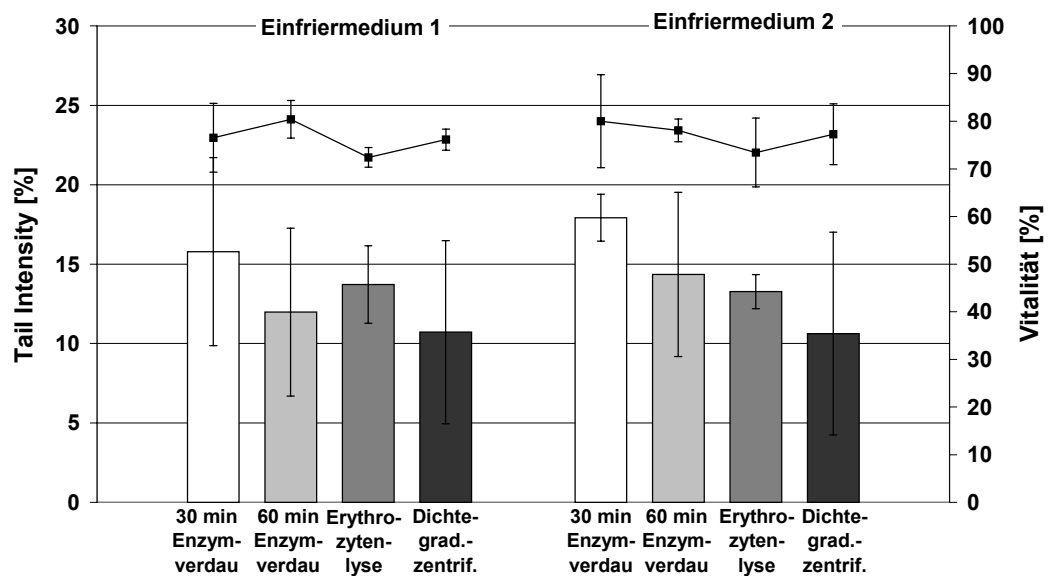


Abbildung 13: Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen, die aus eingefrorenen Kolonepithelstreifen isoliert wurden. Vergleich von Einfriermedium 1 und 2.

Angaben als MW \pm SD (n = 3-4).

Der Vergleich der ermittelten Zellvitalitäten und DNS-Basisschadensraten ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Einfriermedien. Die Ergebnisse konnten daher zusammengefasst und weitere Versuche in die Auswertung einbezogen werden (n = 6-22 für die Vitalität; n = 6-14 für die Tail Intensity). Nach Zusammenfassung der Versuche (Abbildung 14) ist der in Abbildung 13 nur als Trend erkennbare Vitalitätsabfall nach Behandlung der Zellen mit Erythrozytenlysepuffer statistisch signifikant. Die Zellvitalität verringerte sich von $80,9 \pm 6,9$ % nach 60 min Enzymverdau auf $71,6 \pm 5,5$ % nach Behandlung der Zellen mit Erythrozytenlysepuffer. Außerdem ist eine signifikante Verringerung der DNS-Basisschadensrate mit längerem Enzymverdau zu erkennen, wobei die TI-Werte von $16,9 \pm 4,2$ % (30 min) auf $10,7 \pm 5,0$ % (60 min) absanken. Die Aufreinigung der Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Vitalität bzw. TI-Werte. Aufgrund der ungenügenden Vitalitäten (ca. 80 %) und der zu hohen TI-Werte (> 10 %) nach 60 min Enzymverdau wurden die Zellen aus eingefrorenem Kolonepithel nicht für Comet-Assay- oder Comet-FISH-Versuche verwendet. Stattdessen wurden alle Arbeiten mit Zellen aus frischem oder kurzfristig aufbewahrtem Kolonepithel durchgeführt.

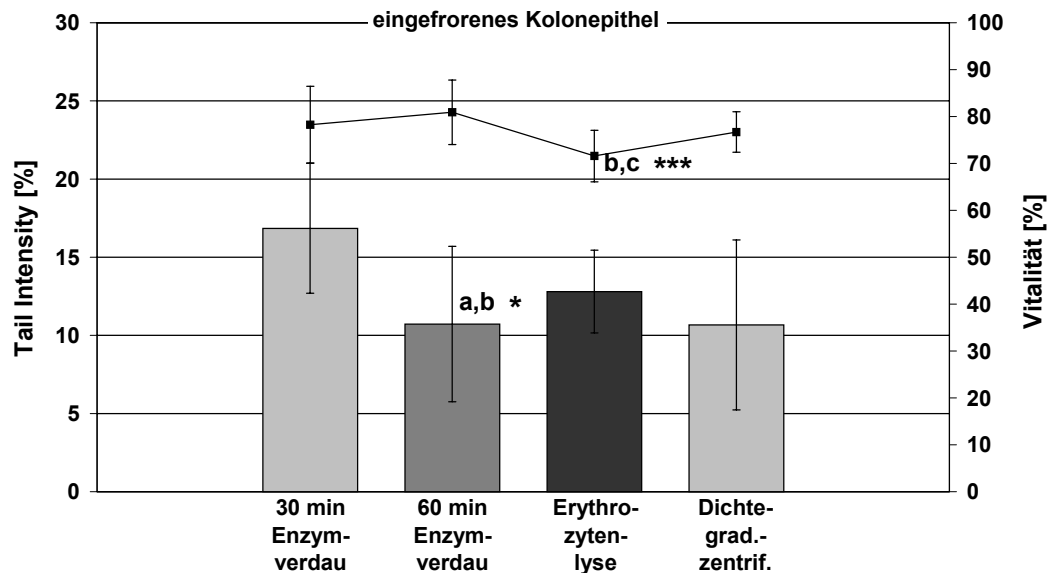


Abbildung 14: Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen, die aus eingefrorenen Kolonepithelstreifen isoliert wurden. Einfluss von Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate.

Angaben als MW \pm SD (n = 6-22 für die Vitalität; n = 6-14 für die Tail Intensity). a,b *: signifikanter Unterschied in den aus eingefrorenem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 30 min und 60 min Enzymverdau; b,c ***: signifikanter Unterschied in den aus eingefrorenem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 60 min Enzymverdau und den Zellen nach Erythrozytenlyse. * p < 0,05; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.1.3 Einfluss von Aufarbeitung und Aufreinigung auf Vitalität und DNS-Basisschäden

4.1.3.1 Dauer des Enzymverdaus

Sowohl bei frisch aufgearbeitetem als auch bei über Nacht in HBSS aufbewahrtem Kolonepithel wurde untersucht, ob die Dauer des Enzymverdaus einen Einfluss auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate der Primärzellen hat. Dazu wurde das zerkleinerte Gewebe 30 min, 60 min bzw. 120 min verdaut und jeweils die Vitalität und die Basisschadensrate der Zellen bestimmt (n = 3). Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen frisch aufgearbeitetem und über Nacht in HBSS aufbewahrtem Kolonepithel. Die Vitalitäten und Basisschadensraten verbesserten sich bei längerem Verdau, statistisch signifikant war jedoch nur die Vitalitätsverbesserung bei dem am gleichen Tag aufgearbeitetem Kolongewebe. Hier betrug die Vitalität nach 30 min Verdau $90,3 \pm 1,8$ % und nach 120 min $94,2 \pm 0,8$ % (Abbildung 15).

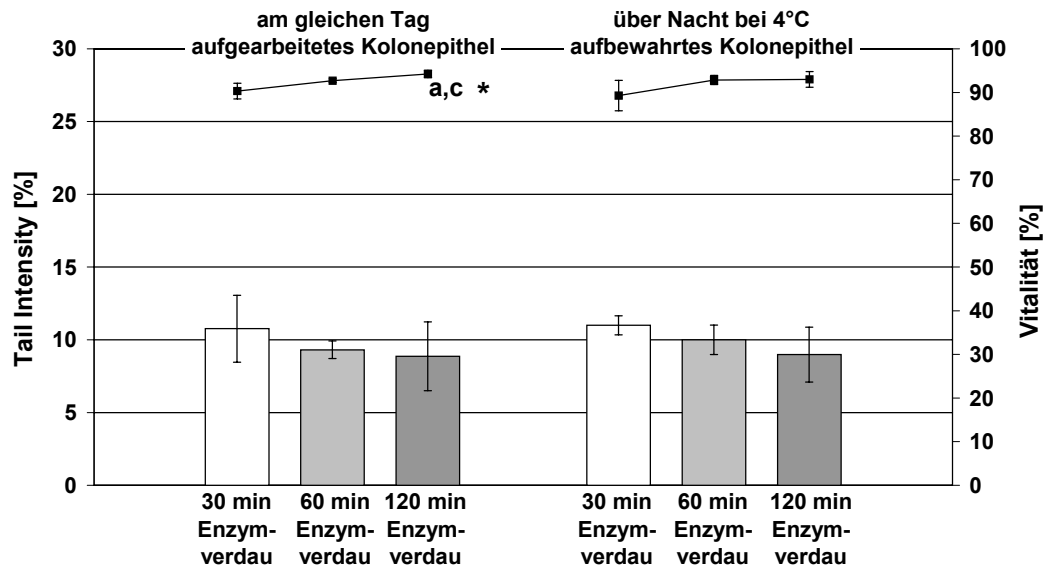


Abbildung 15: Einfluss des Enzymverdaus auf Vitalität und DNS-Basischadensrate von Primärzellen. Vergleich von direkt aufgearbeitetem mit über Nacht aufbewahrtem Kolonepithel.

Angaben als MW \pm SD (n = 3). a,c *: signifikanter Unterschied in den aus am gleichen Tag aufgearbeiteten Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 30 min und 120 min Enzymverdau. * p < 0,05 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.1.3.2 Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation

Im Gegensatz zur Biopsieaufarbeitung stellte sich bei der Verwendung von Kolongewebe das Problem, dass die nach Enzymverdau erhaltenen Zellsuspensionen relativ häufig Erythrozyten und Zelltrümmer enthielten. Um diese Suspensionen weiter aufzureinigen wurden die Erythrozyten durch Behandlung mit Erythrozytenlysepuffer und die nicht vitalen Zellen und Zelltrümmer durch Dichtegradientenzentrifugation aus der Primärzellsuspension entfernt. Hierzu wurden vier Versuche sowohl mit direkt aufgearbeitetem als auch mit über Nacht aufbewahrtem Kolonepithel durchgeführt. Die zerkleinerten Epithelstreifen wurden 30 min, 60 min bzw. 120 min verdaut und nach 120 min Verdau mit Erythrozytenlysepuffer behandelt. Anschließend wurde die Zellsuspension der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt (n = 4 für die Vitalitäten; n = 3 für die TI-Werte).

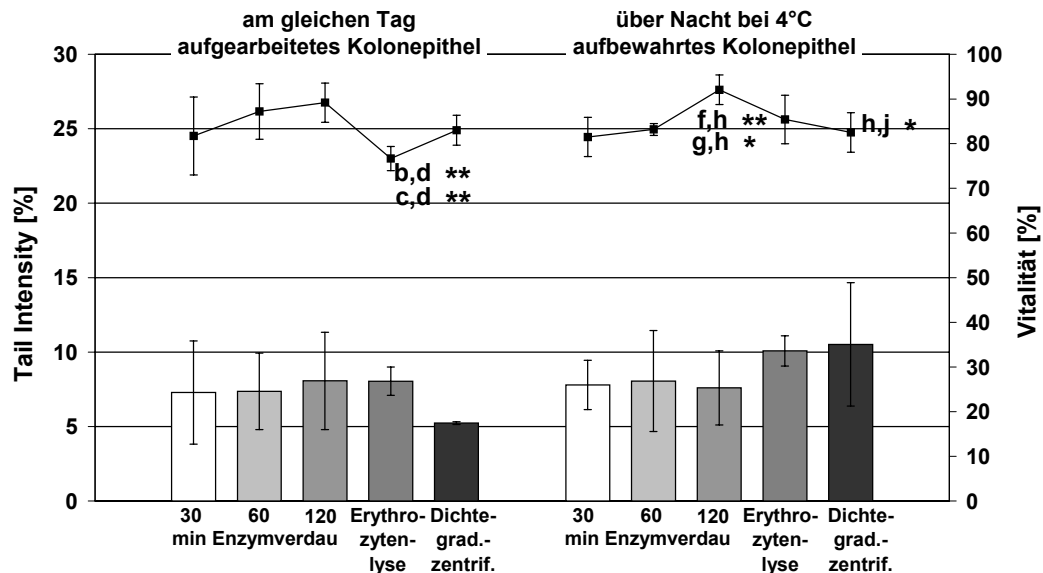


Abbildung 16: Einfluss von Enzymverdau, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen. Vergleich von direkt aufgearbeitetem und über Nacht aufbewahrtem Kolonepithel.

Angaben als MW \pm SD (n = 4 für die Vitalität; n = 3 für die Tail Intensity). b,d **: signifikanter Unterschied in den aus am gleichen Tag aufgearbeitetem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 60 min Enzymverdau und nach Erythrozytenlyse; c,d **: signifikanter Unterschied in den aus am gleichen Tag aufgearbeitetem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 120 min Enzymverdau und nach Erythrozytenlyse; f,h **: signifikanter Vitalitätsunterschied in den aus über Nacht aufbewahrtem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 30 min und 120 min Enzymverdau; g,h *: signifikanter Vitalitätsunterschied in den aus über Nacht aufbewahrtem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 60 min und 120 min Enzymverdau; h,j *: signifikanter Vitalitätsunterschied in den aus über Nacht aufbewahrtem Epithel isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 120 min Enzymverdau und nach Dichtegradientenzentrifugation. ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, ergaben sich keine Unterschiede zwischen frisch aufgearbeitetem und über Nacht in HBSS aufbewahrtem Kolonepithel. Beim direkt aufgearbeitetem Gewebe wurde die Vitalität der Kolonepithelzellen durch Erythrozytenlyse signifikant vermindert. Diese sank von $89,2 \pm 4,4$ % auf $76,7 \pm 2,7$ %, wobei sich die verschlechterte Vitalität nicht auf die im Comet-Assay bestimmte Basisschadensrate auswirkte. Bei den Zellen, die aus den über Nacht aufbewahrtem Epithelstreifen isoliert wurden, ließ sich eine signifikante Vitalitätsverbesserung bei längerem Enzymverdau erkennen. Hingegen ließen sich auch hier bei den im Comet-Assay bestimmten Basisschäden keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Nach Dichtegradientenzentrifugation waren außer der Primärzellbande keine weiteren Zellbanden zu erkennen. Die Zellen zeigten gegenüber den Zellen nach Erythrozytenlyse keine signifikante Verbesserung der Vitalität oder DNS-Basisschadensrate. Die Abtrennung der Zelltrümmer war hingegen erfolgreich und ließ sich unter dem Mikroskop eindeutig erkennen. Als Nachteil muss angesehen werden, dass es aufgrund der Dichtegradientenzentrifugation zu hohen Zellverlusten kam. Diese Zellverluste waren signifikant und betrugen durchschnittlich $47,3 \pm 9,7$ % der eingesetzten Zellmenge.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse führt dazu, dass einige zuvor nur als Trend erkennbaren Veränderungen statistisch signifikant werden (Abbildung 17) ($n = 12$ bzw. 14 für die Dauer des Enzymverdaus, $n = 6$ bzw. 8 für die weitere Aufreinigung). So verbesserte sich die Zellvitalität mit Verlängerung des Enzymverdaus von 30 min ($85,1 \pm 6,5\%$) auf 120 min ($91,9 \pm 3,4\%$) deutlich, wohingegen die Erythrozytenlyse zu einer signifikanten Vitalitätsverschlechterung von $88,5 \pm 5,2\%$ (nach 60 min Verdaus) bzw. $91,9 \pm 3,4\%$ (nach 120 min Verdaus) auf $81,1 \pm 6,1\%$ führte. Diese schlechte Zellvitalität verbesserte sich auch nicht nach Dichtegradientenzentrifugation. Die im Comet-Assay gemessenen Basisschadensraten unterschieden sich nicht signifikant.

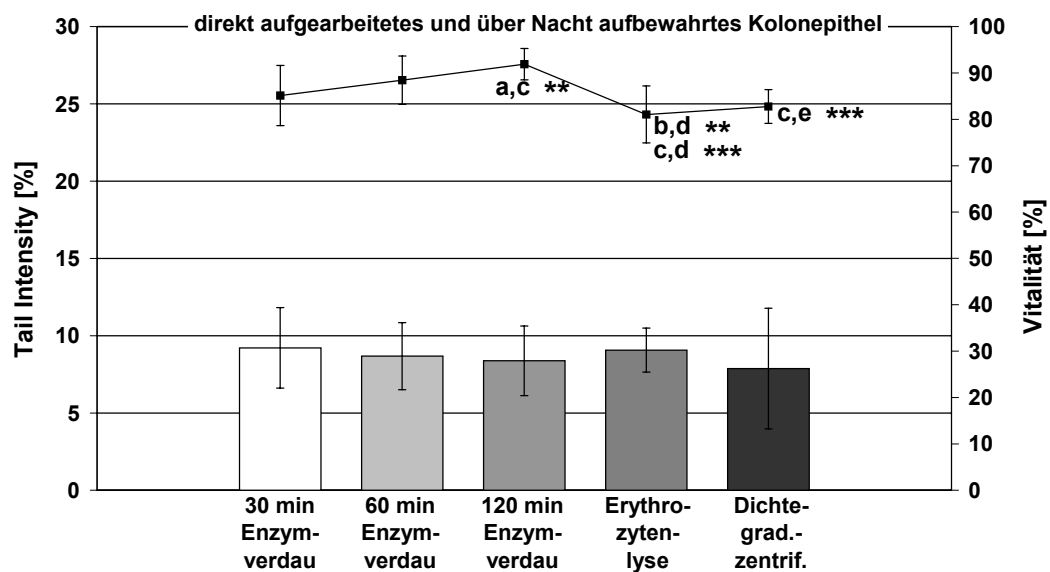


Abbildung 17: Einfluss von Enzymverdaus, Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate von Primärzellen.

Angaben als MW \pm SD ($n = 12$ bzw. 14 für die Dauer des Enzymverdaus, $n = 6$ bzw. 8 für Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation). a,c **: signifikanter Vitalitätsunterschied in den isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 30 min und 120 min Enzymverdaus; b,d **: signifikanter Vitalitätsunterschied in den isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 60 min Enzymverdaus und nach Erythrozytenlyse; c,d ***: signifikanter Vitalitätsunterschied in den isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 120 min Enzymverdaus und nach Erythrozytenlyse; c,e ***: signifikanter Vitalitätsunterschied in den isolierten Primärzellen zwischen den Zellen nach 120 min Enzymverdaus und nach Dichtegradientenzentrifugation. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.1.3.3 Magnetische Zellseparation

Eine zusätzliche Charakterisierung der Zellpopulation (Diskriminierung zwischen Kolonepithelzellen und Lymphozyten bzw. sonstigen Zellen) wurde mittels beadgekoppelter Antikörper (DynaBeads® BerEP4 anti-epithelial cell) an drei Präparaten versucht. Als Positivkontrolle wurden parallel zu den frisch isolierten Kolonprimärzellen HT29clone19a-Zellen inkubiert. Die Abtrennung epithelialer Zellen aus den Primärzellsuspensionen mittels beadgekoppelter Antikörper verlief erfolglos, da diese nicht mit den primären Kolonzellen reagierten. Die Abtrennung der parallel inkubierten HT29clone19a-Zellen hingegen gelang ohne Probleme. Ein möglicher Einfluss des Enzymverdaus auf die sich an der Zelloberfläche

befindenden Antigene der Primärzellen wurde ausgeschlossen, da die beadgekoppelten Antikörper auch nach rein mechanischer Gewebeaufarbeitung nicht mit den Zellen reagierten. Die Quantifizierung der in den Primärzellsuspensionen vorliegenden Epithelzellen mittels magnetischer Zellseparation war somit nicht möglich.

4.1.4 Bestimmung von Vitalität und Apoptose

4.1.4.1 Vergleichende tot-vital-Färbungen in primären Kolonzellen und Krypten

Um in den verschiedenen Versuchssystemen aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssen sowohl die isolierten primären Zellen als auch die Kolonkrypten eine gute Vitalität (> 80 %) aufweisen. Zur Vitalitätsbestimmung wurden neben dem Trypanblau-Ausschlusstest auch tot-vital-Färbungen mit FDA/Ethidiumbromid und FDA/Trypanblau vorgenommen. Die unterschiedlichen tot-vital-Färbungen wurden an direkt isolierten primären Kolonzellen (n = 3), an isolierten Primärzellen aus aufgetautem Kolonepithel (n = 3), an eingefrorenen und wieder aufgetauten Primärzellen (n = 2) und zu Vergleichszwecken auch an HT29clone19a-Zellen (n = 3) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 dargestellt.

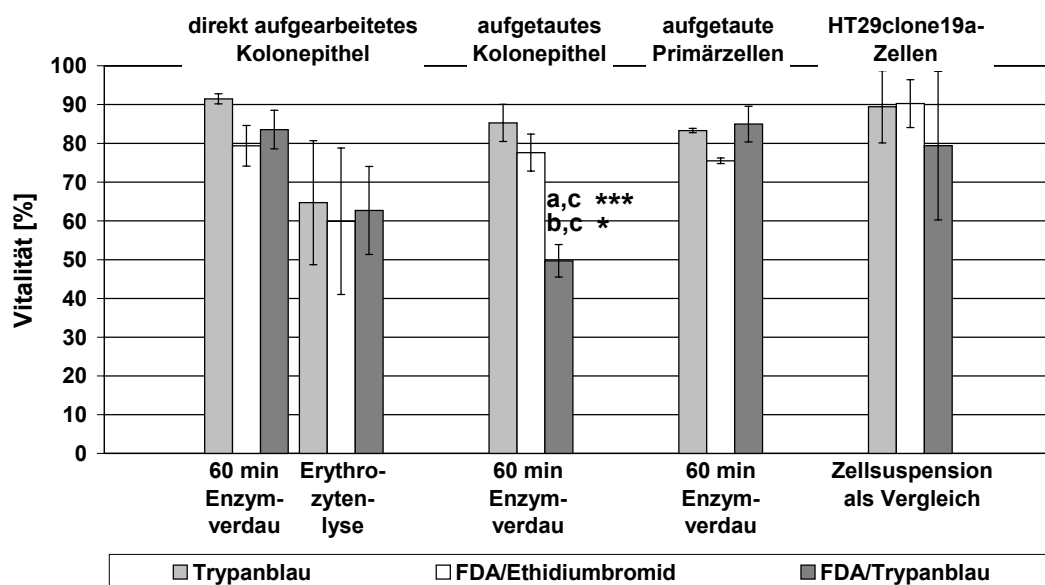


Abbildung 18: Vergleich verschiedener tot-vital-Färbungen. Bestimmung der Vitalität mit Trypanblau, FDA/Ethidiumbromid sowie FDA/Trypanblau.

Angaben als MW \pm SD (n = 2-3). a,c ***: signifikanter Vitalitätsunterschied in den aus eingefrorenem Epithel isolierten Primärzellen zwischen der Vitalitätsbestimmung mit Trypanblau und der Vitalitätsbestimmung mit FDA/Trypanblau; b,c *: signifikanter Vitalitätsunterschied in den aus eingefrorenem Epithel isolierten Primärzellen zwischen der Vitalitätsbestimmung mit FDA/Ethidiumbromid und der Vitalitätsbestimmung mit FDA/Trypanblau. * p < 0,05; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die verschiedenen tot-vital-Färbungen führten zumeist zu vergleichbaren Ergebnissen in der gemessenen Vitalität. Statistisch signifikante Abweichungen wurden nur bei den nach 60 min Enzymverdau eingefrorenen und für die Versuche wieder aufgetauten Primärzellen gefunden. Hier war die mit FDA/Trypanblau bestimmte Vitalität statistisch signifikant verringert ($49,7 \pm 4,2$ %) gegenüber der mit Trypanblau bzw. der mit FDA/Ethidiumbromid bestimmten Vitalität ($85,3 \pm 4,8$ % bzw. $77,6 \pm 4,8$ %). In Abbildung 19 sind mit FDA/Ethidiumbromid bzw.

mit FDA/Trypanblau gefärbte primäre Kolonzellen und HT29clone19a-Zellen exemplarisch dargestellt.

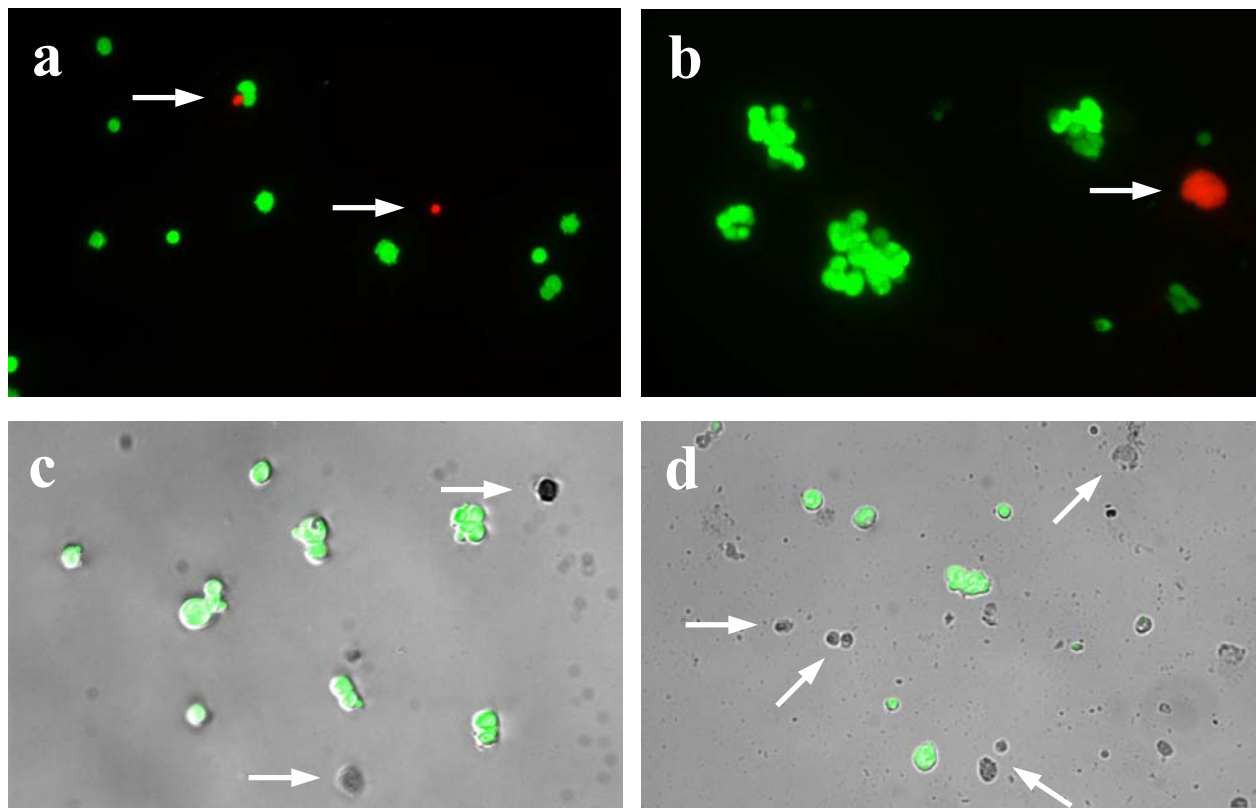


Abbildung 19: Mit FDA/Ethidiumbromid gefärbte a) HT29clone19a-Zellen bzw. b) primäre Kolonzellen sowie mit FDA/Trypanblau gefärbte c) HT29clone19a-Zellen bzw. d) primäre Kolonzellen.

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera. In den Abbildungen sind die toten Zellen jeweils durch Pfeile kenntlich gemacht.

Für die Kolonkrypten ergaben sich bei den unterschiedlichen tot-vital-Färbungen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Vitalität war bei allen Färbemethoden gleich gut und lag für Trypanblau bei $91,4 \pm 0,8 \%$, für FDA/Ethidiumbromid bei $90,2 \pm 1,7 \%$ und für FDA/Trypanblau bei $91,2 \pm 2,5 \%$ ($n = 3$) (Abbildung 20).

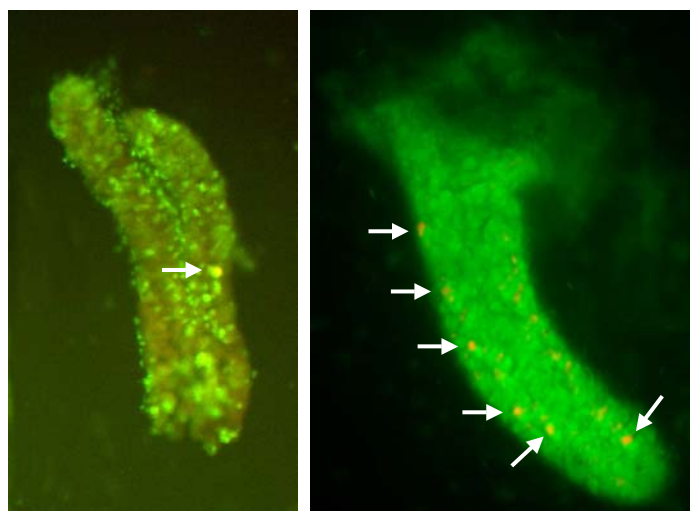


Abbildung 20: Mit FDA/Ethidiumbromid angefärbte Kolonkrypten.

Aufnahme der Krypten in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera. In den Abbildungen sind die toten Zellen jeweils durch Pfeile kenntlich gemacht.

4.1.4.2 Bestimmung der Apoptose in Kolonkrypten mit Annexin V-FITC

Durch Anfärbung mit Annexin V-FITC lassen sich apoptotische, spätapoptotische und nekrotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachweisen und quantifizieren. Die aus dem Kolongewebe durch Enzymverdau isolierten Krypten wurden mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In den frisch isolierten Kolonkrypten ließen sich 5-10 apoptotische und 3-5 nekrotische Zellen je Krypte nachweisen. Spätapoptotischen Zellen ließen sich im Zellverband der Krypten nicht eindeutig von den nekrotischen Zellen unterscheiden. Eine spezifische Verteilung der apoptotischen und nekrotischen Zellen nach oberem und unterem Kryptbereich war nicht erkennbar. Nach etwa vier Stunden setzte bei RT der Zerfall der Krypten ein, wobei der Anteil apoptotischer und nekrotischer Zellen insbesondere im oberen Kryptbereich, wo die Krypte aus dem Gewebe herausgebrochen war, kontinuierlich anstieg.

4.2 Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay

Ziel der Comet-Assay-Versuche war es, die generelle DNS-schädigende Wirkung der Testsubstanzen in humanen Kolonzellen zu untersuchen. Dazu wurden Zellen der HT29clone19a-Kolonkarzinomzelllinie, Zellen der LT97-Kolonadenomzelllinie und primäre, aus humanem Kolongewebe isolierte Kolonzellen verwendet. Diese Zellen entsprechen den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Kolonkarzinogenese und ermöglichen die Untersuchung der spezifischen Sensitivität dieser Tumorstadien. Für die Modellsubstanzen (H_2O_2 , Hexenal und HNE) wurden Konzentrationsprofile erstellt, um die Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge zu erfassen und einen geeigneten Konzentrationsbereich für die Reparaturversuche zu ermitteln. Die Reparatur der induzierten DNS-Schäden wurde jeweils über 120 min verfolgt. Während die global DNS-schädigende Wirkung der Testsubstanzen mittels Comet-Assay erfasst wurde, wurden die genspezifischen Effekte mittels Comet-FISH (siehe Abschnitt 4.3) quantifiziert. Die Vitalität der Zellen wurde vor Versuchsbeginn und nach der jeweiligen Inkubation mit den Testsubstanzen bestimmt. Alle verwendeten Zellen wiesen eine Vitalitäten $> 80 \%$ auf, wodurch sichergestellt wurde, dass die mittels Comet-Assay gemessenen DNS-Schäden auf genotoxischen und nicht auf zytotoxischen Effekten beruhten.

4.2.1 HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen

4.2.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge

In HT29clone19a-Zellen ergaben sich für die getesteten Substanzen gute Konzentrationsprofile, die in den Abbildungen 21 a-c dargestellt sind. Die Schädigung mit H_2O_2 wurde sowohl im Tube ($n = 6$) als auch auf dem OT ($n = 3$) durchgeführt. Da sich zwischen der Schädigung im Tube

und auf dem OT keine Unterschiede im Ausmaß der DNS-Schäden ergaben, wurden die Versuche zusammengefasst. In Abbildung 21 a ist zu erkennen, dass H_2O_2 ab einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ signifikante DNS-Schäden induziert ($\text{TI} = 23,3 \pm 6,8 \%$). Auch für Hexenal wurde ein eindeutiger Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang nachgewiesen ($n = 5$). Hexenal wirkte ab einer Konzentration von $1600 \mu\text{M}$ mit einem TI-Wert von $17,7 \pm 8,2 \%$ signifikant DNS-schädigend (Abbildung 21 b). Das Konzentrationsprofil für HNE ist in Abbildung 21 c dargestellt und zeigt, dass HNE ab $200 \mu\text{M}$ signifikante DNS-Schäden setzte ($\text{TI} = 19,2 \pm 4,6 \%$) ($n = 13$).

HT29clone19a-Zellen

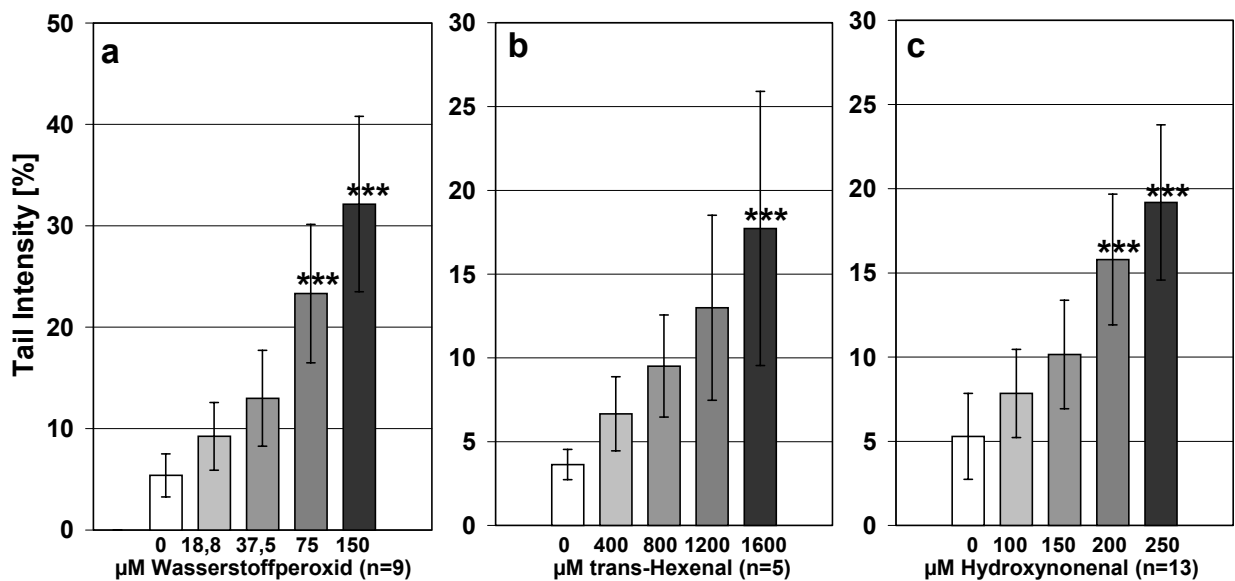


Abbildung 21: Schädigung von HT29clone19a-Zellen mit a) 0-150 μM H_2O_2 , b) 0-1600 μM Hexenal bzw. c) 0-250 μM HNE.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.1.2 Reparatur der DNS-Schäden

Für die Untersuchungen zur Reparatur H_2O_2 -induzierter DNS-Schäden wurden die HT29clone19a-Zellen mit $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 geschädigt. Wie bei den Konzentrationsprofilen wurden die Versuche auch hier mit suspendierten Zellen im Tube ($n = 4$) und mit bereits in Agarose eingebetteten Zellen ($n = 4$) durchgeführt. Da zwischen den zwei Versuchsserien keine statistisch signifikanten Unterschiede bestanden, wurden die Ergebnisse zusammengefasst. Zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ lagen die durch $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 induzierten DNS-Schäden bei $44,1 \pm 6,5 \%$ TI. Bereits nach 30 min war diese Schädigung signifikant auf $22,7 \pm 7,1 \%$ verringert, blieb jedoch auch nach insgesamt 120 min Reparatur immer noch statistisch signifikant ($\text{TI} = 14,4 \pm 8,2 \%$) (Abbildung 22).

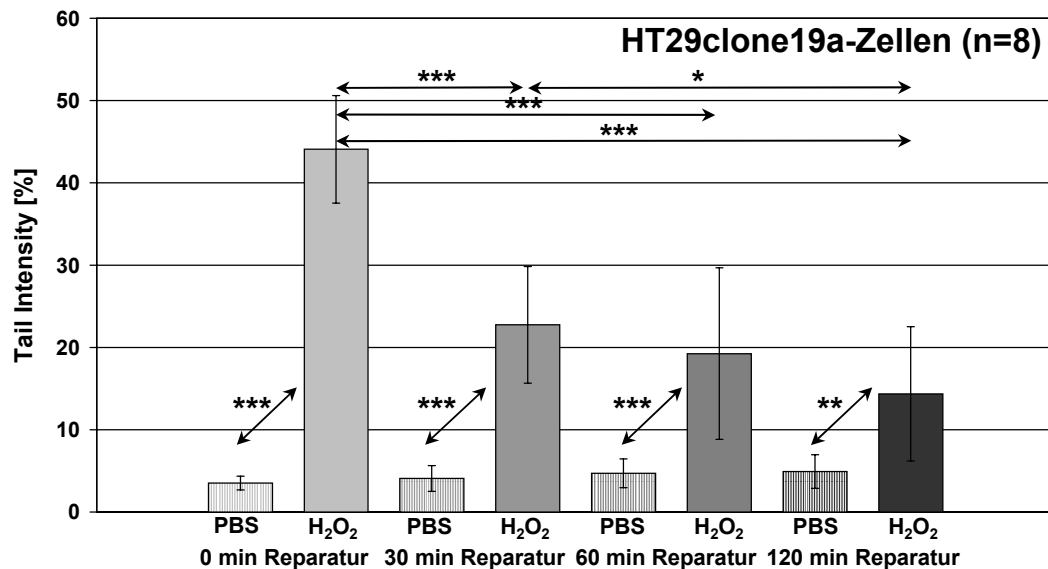


Abbildung 22: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch 150 µM H₂O₂ (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW ± SD. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Schädigung der HT29clone19a-Zellen mit 400 µM Hexenal und die sich anschließende Reparatur wurden in Zellsuspension im Tube durchgeführt. Die Zusammenfassung der Versuchsergebnisse ist in Abbildung 23 dargestellt (n = 5). Die durch Hexenal induzierten Schäden lagen zum Zeitpunkt t = 0 min bei 14,1 ± 1,9 % und waren nach 30 min bereits signifikant auf 8,6 ± 2,5 % reduziert. In dieser Versuchsreihe lagen nach 120 min Reparatur keine signifikanten DNS-Schäden mehr vor (TI = 6,27 ± 1,0 %).

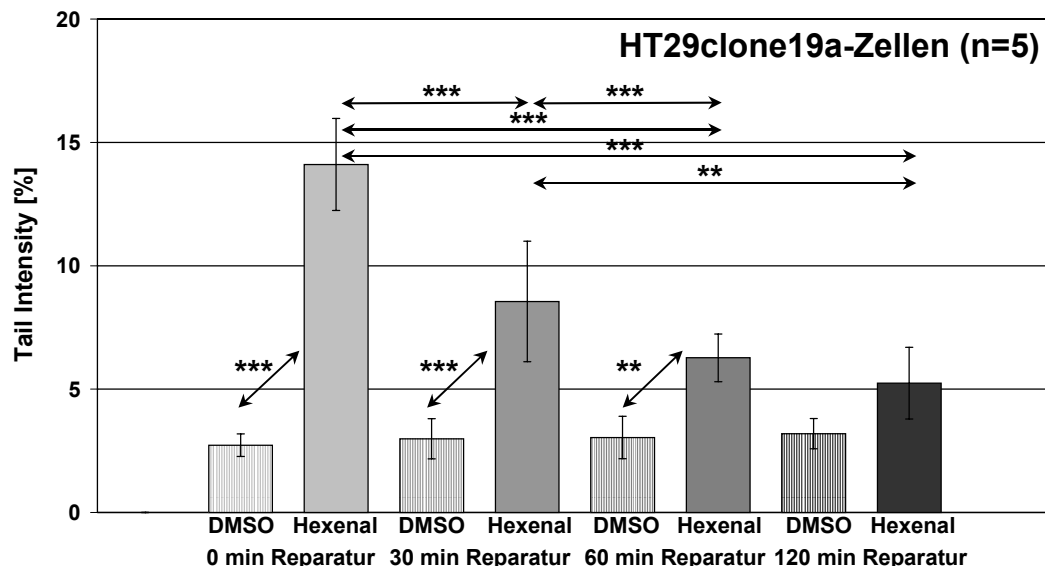


Abbildung 23: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch 400 µM Hexenal (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW ± SD. ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Bei Schädigung der HT29clone19a-Zellen mit 200 µM HNE zeigte sich, dass die zum Zeitpunkt t = 0 induzierten Schäden von 28,9 ± 9,1 % nicht repariert wurden, sondern nach 30 bzw. 60 min

sogar signifikant anstiegen ($60,5 \pm 3,1$ % bzw. $68,9 \pm 5,3$ %), um dann nach 120 min tendenziell zu fallen ($TI = 60,0 \pm 0,7$ %) ($n = 2$) (ohne Abbildung). Für weitere Versuche ($n=4$) wurde die HNE-Konzentration auf $150 \mu\text{M}$ gesenkt. Die in Abbildung 24 zusammengefassten Ergebnisse sind hinsichtlich ihres Verlaufes identisch mit den Reparaturversuchen nach $200 \mu\text{M}$ HNE. Die durch $150 \mu\text{M}$ HNE zum Zeitpunkt $t = 0$ min induzierten Schäden ($TI = 11,9 \pm 1,5$ %) stiegen nach 30 min auf $22,5 \pm 5,1$ % und nach 60 min auf $24,5 \pm 7,1$ % an. Nach 120 min sank der TI-Wert tendenziell auf $19,5 \pm 6,6$ % TI ab, wobei die Zellen zu diesem Zeitpunkt nach wie vor signifikant geschädigt waren.

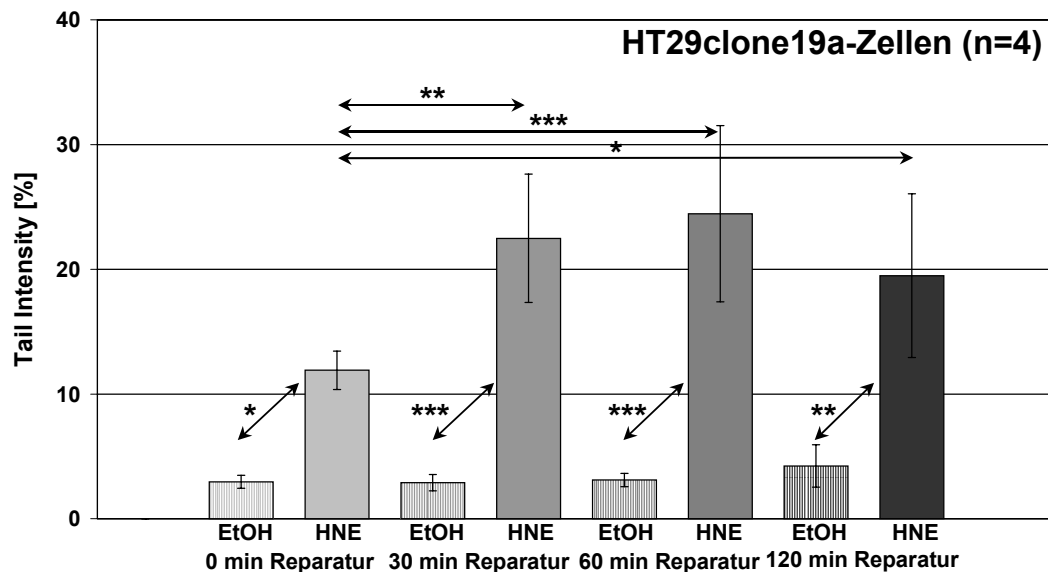


Abbildung 24: Reparatur von DNS-Schäden in HT29clone19a-Zellen nach Schädigung durch $150 \mu\text{M}$ HNE (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.2 Primäre Kolonzellen

4.2.2.1 Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge

Die Schädigung der isolierten Primärzellen mit H_2O_2 wurde sowohl im Tube ($n = 5$) als auch auf dem Objektträger ($n = 6$) durchgeführt. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen diesen Versuchsreihen, so dass die Ergebnisse zusammengefasst wurden ($n = 11$) (Abbildung 25 a). In den primären Kolonzellen setzte H_2O_2 ab einer Konzentration von $37,5 \mu\text{M}$ signifikante Schäden ($TI = 16,8 \pm 4,2$ %). Das in einer weiteren Versuchsreihe eingesetzte Hexenal führte in den Primärzellen ab $400 \mu\text{M}$ zu signifikanten Schäden, wobei der TI-Wert bei $12,1 \pm 3,7$ % lag (Abbildung 25 b) ($n=9$). Mit steigender Konzentration nahm die Schädigung weiter zu und erreichte bei $1600 \mu\text{M}$ Hexenal einen TI-Wert von $19,6 \pm 3,0$ %. Auch HNE induzierte in den primären Kolonzellen dosisabhängige Schäden. Diese waren bereits ab $100 \mu\text{M}$ HNE signifikant und lagen bei $11,4 \pm 3,2$ %. Die Ergebnisse von 13 Versuchen wurden zusammengefasst und sind in Abbildung 25 c zu sehen.

primäre Kolonzellen

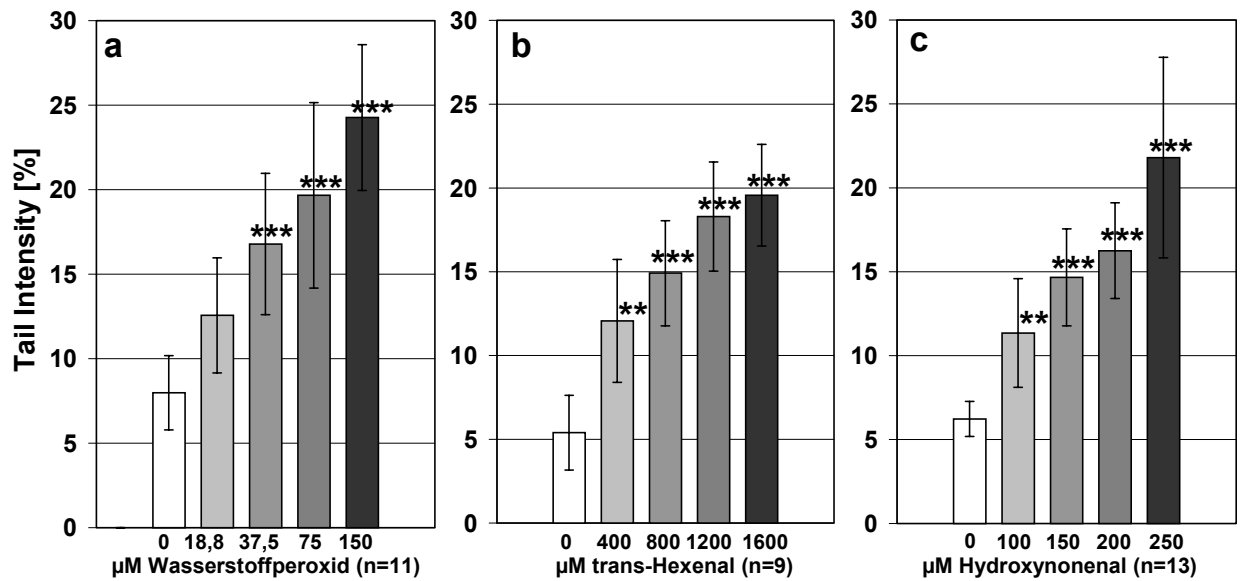


Abbildung 25: Schädigung von Primärzellen mit a) 0-150 μM H_2O_2 , b) 0-1600 μM Hexenal bzw. c) 0-250 μM HNE.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.2.2 Reparatur der DNS-Schäden

Auch bei den Versuchen zur Reparatur H_2O_2 -induzierter Schäden in primären Kolonzellen wurden die Zellen im Tube ($n = 2$) bzw. auf dem Objektträger ($n = 2$) geschädigt und die Ergebnisse zusammengefasst, da kein Unterschied zwischen den beiden Schädigungsarten nachzuweisen war ($n = 4$) (Abbildung 26). Die durch 150 μM H_2O_2 induzierten Schäden betrugen zum Zeitpunkt $t = 0$ min $27,6 \pm 3,6$ % und waren schon nach 30 min signifikant auf $16,8 \pm 0,8$ % reduziert. Nach 120 min unterschied sich der TI-Wert der H_2O_2 -behandelten Zellen ($\text{TI} = 14,2 \pm 1,4$ %) nach wie vor signifikant von dem der PBS-behandelten Kontrollzellen ($\text{TI} = 7,0 \pm 1,1$ %).

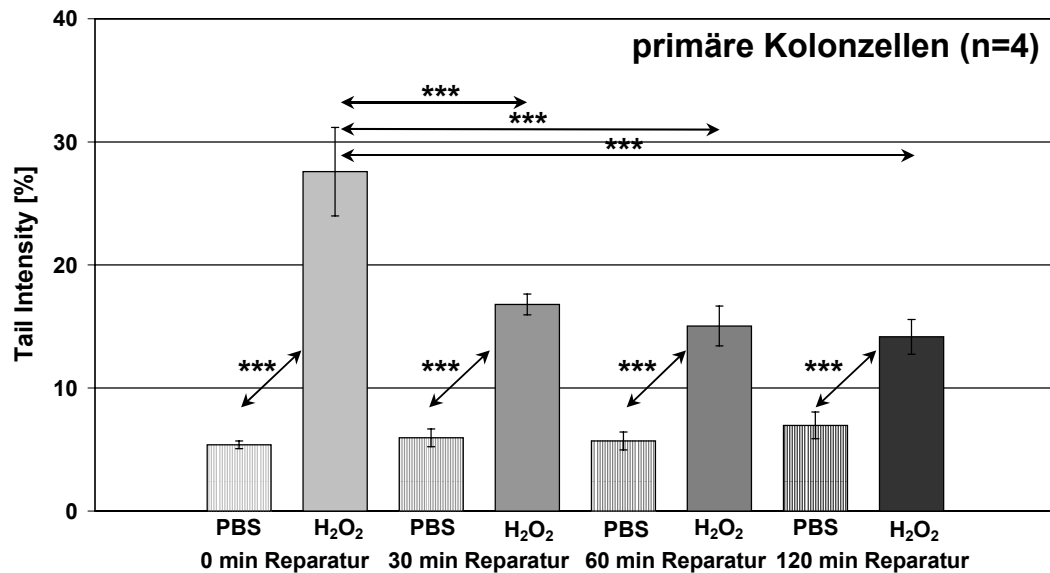


Abbildung 26: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 150 µM H₂O₂ (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW ± SD. *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In den Primärzellen induzierten 400 µM Hexenal (Abbildung 27) (n = 3) signifikante Schäden, welche zum Zeitpunkt t = 0 min bei 16,0 ± 0,7 % lagen. Diese wurden innerhalb der ersten 30 min signifikant repariert, wobei der TI-Wert auf 13,9 ± 0,2 % sank. Auch im Weiteren erfolgte eine signifikante Reparatur, wobei die induzierten DNS-Schäden bis zum Zeitpunkt t = 120 min jedoch nicht vollständig repariert wurden.

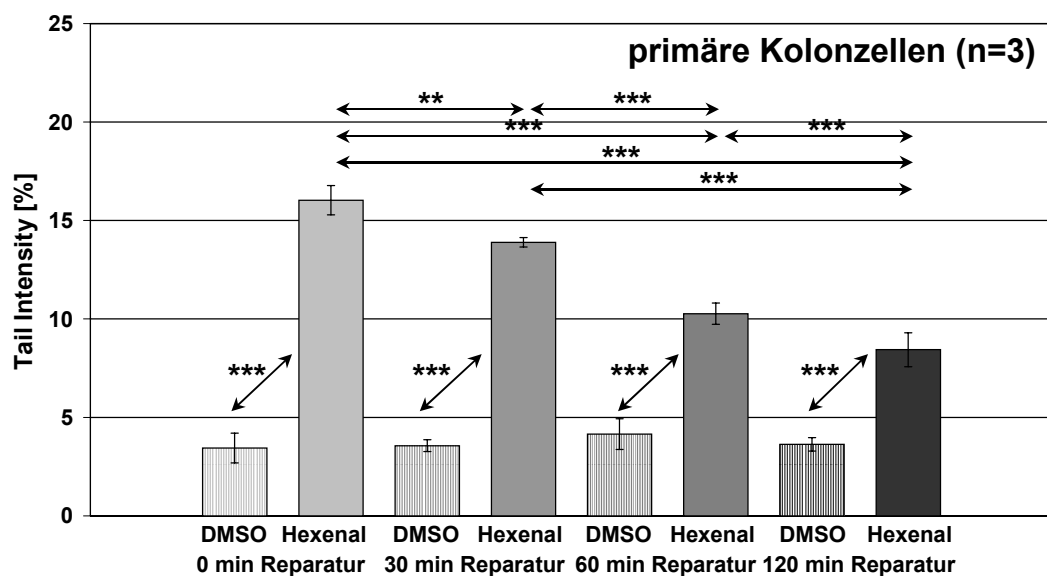


Abbildung 27: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 400 µM Hexenal (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW ± SD. ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In Abbildung 28 ist das Reparaturverhalten HNE-geschädigter Primärzellen dargestellt (n = 5). Der TI-Wert zum Zeitpunkt t = 0 min lag bei 15,9 ± 4,8 % und stieg während der ersten 60 min der Reparatur signifikant auf 29,9 ± 1,0 % an. Im Weiteren sank der TI-Wert statistisch

signifikant und lag nach $t = 120$ min bei $19,5 \pm 6,2$ % und damit signifikant über dem Wert der Kontrollzellen.

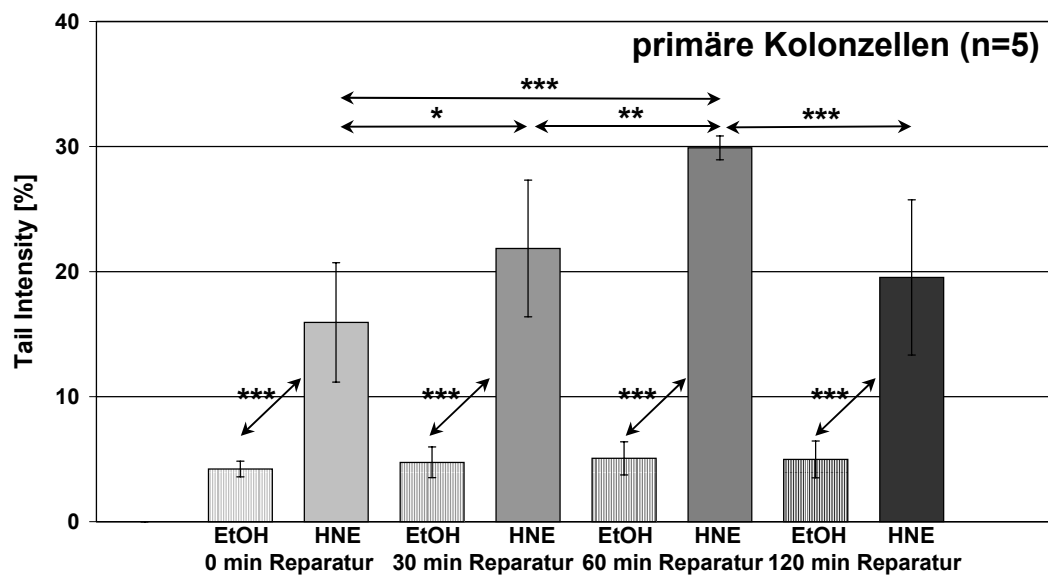


Abbildung 28: Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung durch 150 µM HNE (0-120 min Reparatur).

Angaben als MW \pm SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.3 LT97-Zellen

4.2.3.1 Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge

Die H_2O_2 -Behandlung der HT29clone19a- und der primären Kolonzellen im Tube bzw. auf dem Objektträger ergab keine Unterschiede, so dass die LT97-Zellen nur in Suspension geschädigt wurden (Abbildung 29 a; $n = 11$). Dabei setzte H_2O_2 bereits in einer Konzentration von $37,5$ µM signifikante Schäden in den LT97-Zellen ($TI = 11,3 \pm 3,5$ %). Insgesamt bestand ein deutlicher Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang, wobei die DNS-Schäden bis auf einen TI-Wert von $30,7 \pm 6,5$ % (150 µM H_2O_2) anstiegen. Die in den LT97-Zellen durch Hexenal induzierten DNS-Schäden waren bereits ab einer Hexenalkonzentration von 400 µM signifikant und lagen bei $10,7 \pm 3,3$ %. Sie stiegen mit höheren Konzentrationen weiter an und erreichten bei 1600 µM Hexenal einen TI-Wert von $24,9 \pm 5,7$ % (Abbildung 29 b; $n = 16$). Um die Wirkung von HNE in LT97-Zellen zu beurteilen wurden zwölf Versuche durchgeführt (Abbildung 29 c). Dabei setzten 100 µM HNE in den LT97-Zellen signifikante DNS-Schäden mit einem TI-Wert von $13,1 \pm 4,1$ %. Diese nahmen bis zur Konzentration von 250 µM HNE zu und entsprachen bei dieser höchsten Konzentration einen TI-Wert von $30,1 \pm 7,6$ %.

LT97-Zellen

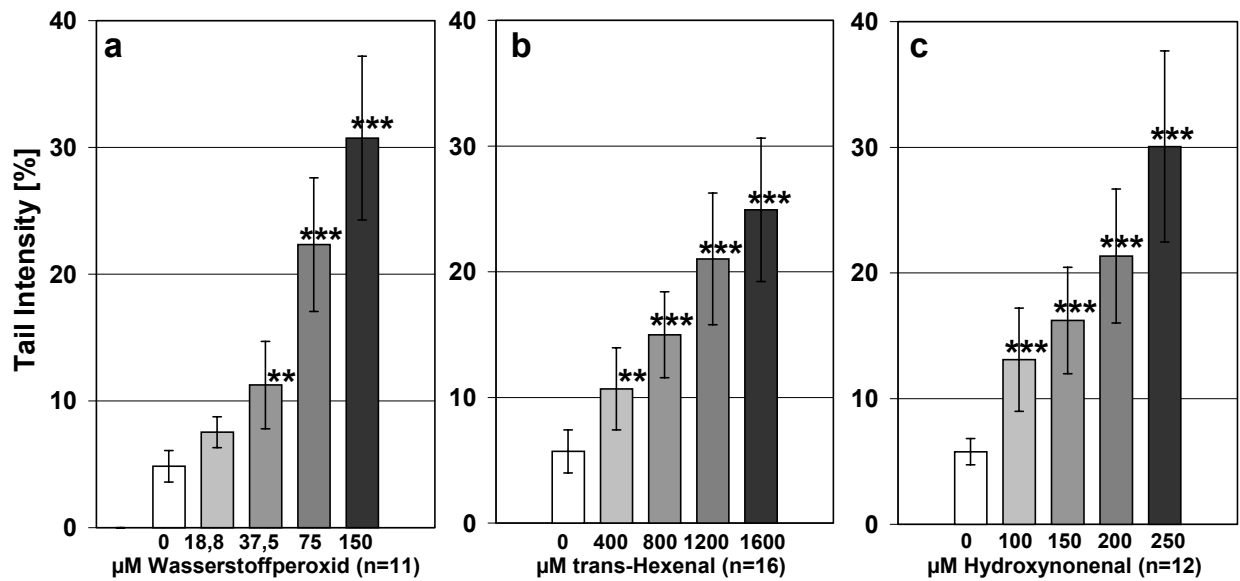


Abbildung 29: Schädigung von LT97-Zellen mit a) 0-150 μM H_2O_2 , b) 0-1600 μM Hexenal bzw. c) 0-250 μM HNE.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.3.2 Reparatur der DNS-Schäden

In den LT97-Zellen wurden nach H_2O_2 - ($n = 3$) und HNE-Inkubation ($n = 2$) Untersuchungen zur Reparatur der induzierten DNS-Schäden durchgeführt. Die Versuchsserie verlief nicht erfolgreich, da sich die Vitalität der Zellen mit zunehmender Reparaturdauer verschlechterte ($< 80\%$). Auch stiegen die gemessenen DNS-Schäden sowohl in den H_2O_2 - bzw. HNE-inkubierten Zellen ($39,8 \pm 9,9\%$ (H_2O_2) bzw. $37,6 \pm 10,9\%$ (HNE); $t = 120$ min) als auch in den Kontrollzellen weiter an und erreichten in diesen TI-Werte $> 10\%$ ($20,1 \pm 14,9\%$ (H_2O_2) bzw. $11,3 \pm 9,5\%$ (HNE); $t = 120$ min) (ohne Abbildung). Auf Versuche mit Hexenal wurde daraufhin verzichtet.

Die innerhalb der 120 Minuten Reparaturzeit abfallenden Vitalitätswerte und die gleichzeitig ansteigenden TI-Werte führten zu der Annahme, dass diese mit der Vereinzelung der LT97-Zellen in den Suspensionen in Zusammenhang standen. Es wurde daher ein Protokoll zur Schädigung und Reparatur der LT97-Zellen in 6-Well-Platten erarbeitet. Um diese Untersuchungen mit den Versuchen im Tube vergleichen zu können, mussten allerdings zuerst Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge in 6-Well-Platten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden adhärent in 6-Well-Platten gewachsene LT97-Zellen mit H_2O_2 ($n = 2$) bzw. HNE ($n = 3$) inkubiert, anschließend geerntet und die induzierten DNS-Schäden mittels Comet-Assay quantifiziert. Die Auswertung der Versuche ergab, dass die in 6-Well-Platten inkubierten Zellen keine Schäden aufwiesen. Sowohl für H_2O_2 als auch für HNE lagen die TI-Werte der Versuche

unter 9 %. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde von Reparaturversuchen im 6-Well-Platten abgesehen (ohne Abbildung).

4.2.4 Vergleich der Testsubstanzen

Die Untersuchung der durch die Testsubstanzen H₂O₂, Hexenal bzw. HNE induzierten DNS-Schäden lässt sowohl Aussagen zur jeweiligen genotoxischen Substanzwirkung als auch zur Reparaturkapazität der jeweiligen Zellen zu. So werden im Folgenden die Genotoxizität der Testsubstanzen, die Reparaturkapazität der Zellen sowie die zellspezifischen Sensitivitäten vorgestellt.

4.2.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge

Die vergleichende Betrachtung der Konzentrationsprofile ergibt für alle drei Zelltypen eine identische Abfolge in der genotoxischen Substanzwirkung: H₂O₂ induzierte jeweils die stärksten DNS-Schäden, gefolgt von HNE und schließlich Hexenal. Dabei führte H₂O₂ in den HT29clone19a-Zellen zu besonders starken Schäden.

4.2.4.2 Reparaturversuche

Der Vergleich der Reparaturversuche zeigt, dass die durch H₂O₂ induzierten Schäden sowohl in HT29clone19a-Zellen als auch in Primärzellen am schnellsten repariert wurden, was in einem starken Abfall des Schadniveaus bereits nach 30 min deutlich wurde. Bei den Hexenal-induzierten Schäden verlief die Reparatur langsamer und bei HNE-induzierten Schäden fand erst nach 60-120 min und nach einem vorausgegangenen Anstieg der TI-Werte eine Reparatur statt. Die LT97-Zellen eigneten sich nicht für Reparaturversuche (siehe Abschnitt 4.2.3.2).

4.2.5 Vergleich der verwendeten Zellen

Da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen unterschiedliche Stadien der kolorektalen Tumorentstehung widerspiegeln, war es von besonderem Interesse, die Sensitivitäten der Zellen miteinander zu vergleichen.

4.2.5.1 HT29clone19a- und LT97-Zellen

Zum direkten Vergleich der Zellen wurden HT29clone19a- und LT97-Zellen parallel aufgearbeitet, mit H₂O₂, Hexenal bzw. HNE inkubiert und die induzierten Schäden mittels Comet-Assay quantifiziert. Die Versuche wurden für jede Testsubstanz in dreifacher Wiederholung durchgeführt und die Ergebnisse in den Abbildungen 30, 31 und 32 dargestellt.

Die Behandlung mit 75 µM H₂O₂ führte sowohl in HT29clone19a- als auch in LT97-Zellen zu signifikanten Schäden, wobei die TI-Werte bei $22,8 \pm 5,1$ % (LT97-Zellen) bzw. bei $22,2 \pm 5,6$ % (HT29clone19a-Zellen) lagen. Die H₂O₂-induzierten Schäden in LT97- und HT29clone19a-Zellen unterschieden sich nicht voneinander (Abbildung 30).

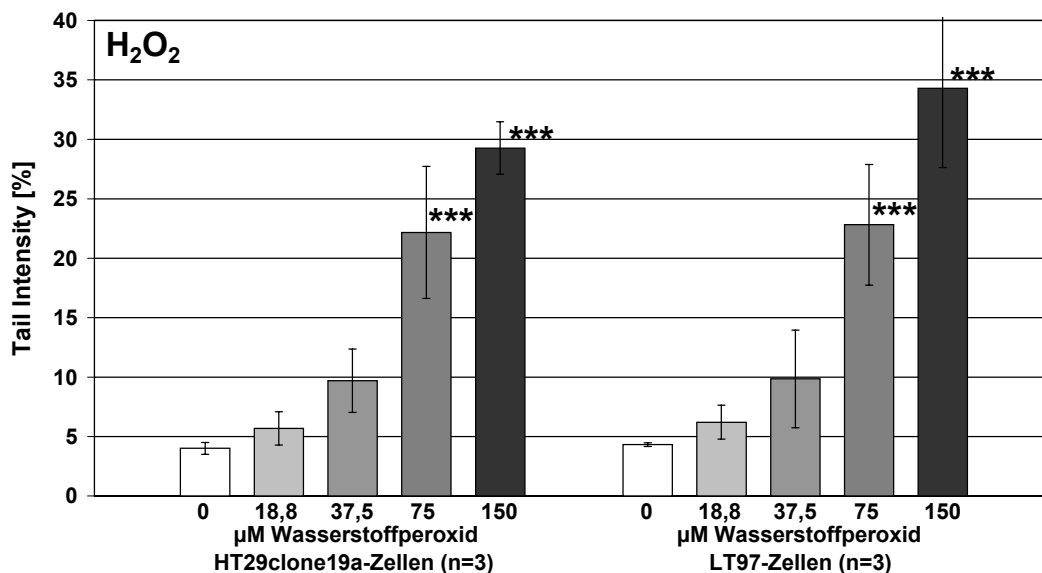


Abbildung 30: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-150 µM H₂O₂.

Angaben als MW ± SD. Behandlung versus Kontrolle: *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Anders als bei den Untersuchungen mit H₂O₂ wiesen bei Behandlung mit Hexenal die LT97-Zellen bereits bei niedrigeren Konzentrationen signifikante DNS-Schäden auf als die HT29clone19a-Zellen (Abbildung 31). So waren die LT97-Zellen bereits nach 800 µM Hexenal signifikant geschädigt (TI = 12,0 ± 1,7 %), die HT29clone19a-Zellen hingegen erst nach Inkubation mit 1200 µM Hexenal (TI = 9,6 ± 1,5 %). Insgesamt wiesen die LT97-Zellen tendenziell höhere Schäden auf, wobei die Unterschiede zwischen den Zelllinien nach Schädigung mit 1200 µM und 1600 µM Hexenal statistisch signifikant waren.

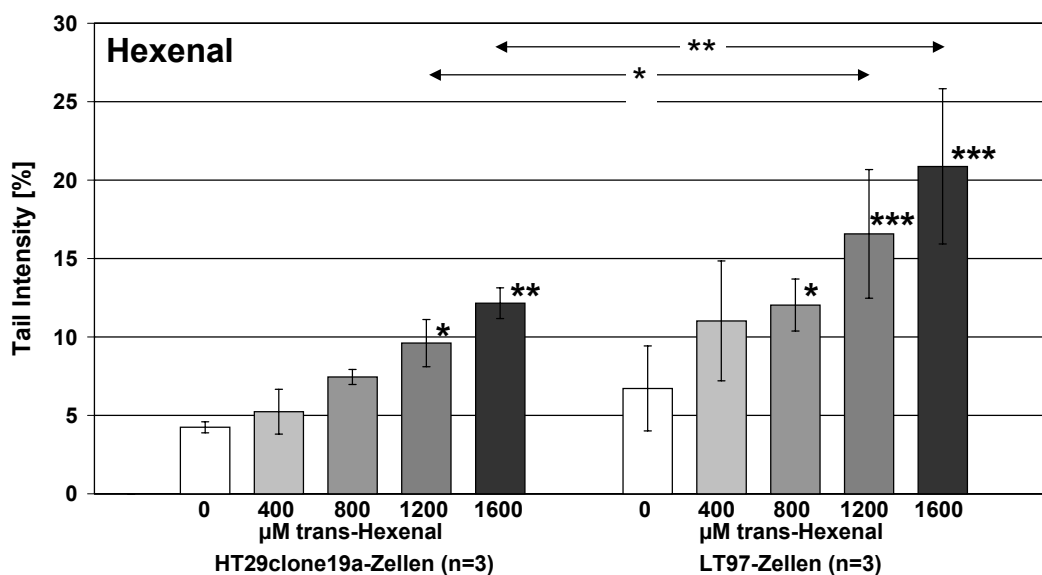


Abbildung 31: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-1600 µM Hexenal.

Angaben als MW ± SD. Behandlung versus Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: * p < 0,05; ** p < 0,01 (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Auch nach HNE-Schädigung wiesen die LT97-Zellen insgesamt höhere Schäden auf als die HT29clone19a-Zellen. Hier waren die Unterschiede zwischen den Zellen für die drei höchsten HNE-Konzentrationen statistisch signifikant (Abbildung 32). Auch wurden die LT97-Zellen bereits durch niedrigere HNE-Konzentrationen signifikant geschädigt, als die HT29clone19a-Zellen. So waren die Schäden in den LT97-Zellen bereits nach Inkubation mit 100 μM HNE statistisch signifikant ($\text{TI} = 12,8 \pm 2,7 \%$). Die HT29clone19a-Zellen wiesen hingegen erst ab 200 μM HNE signifikante Schäden auf ($\text{TI} = 13,4 \pm 1,1 \%$).

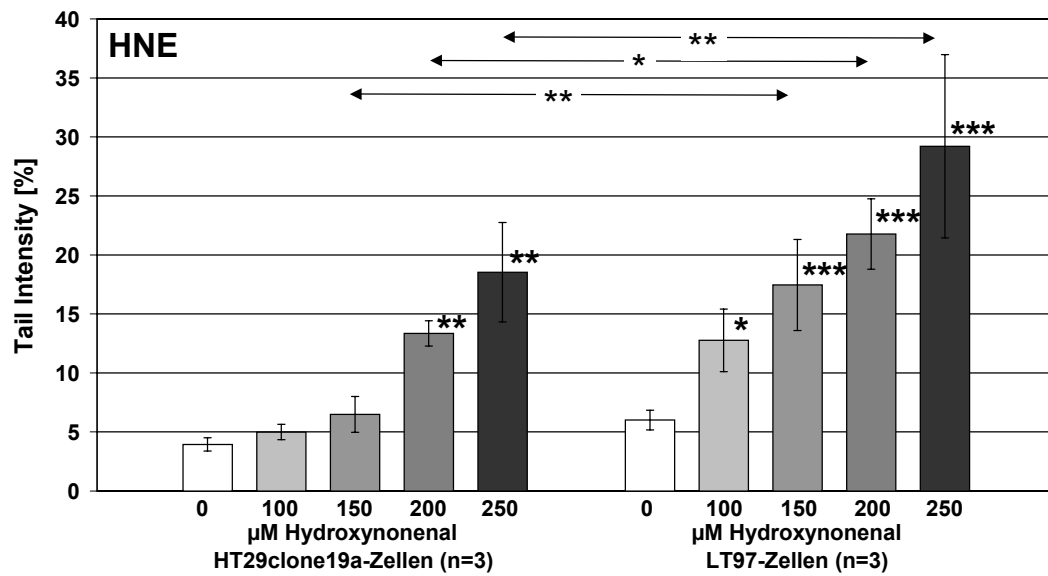


Abbildung 32: Direkter Vergleich von HT29clone19a-Zellen und primären Kolonzellen. Schädigung durch 0-250 μM HNE.

Angaben als $\text{MW} \pm \text{SD}$. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.5.2 HT29clone19a-, LT97- und Primärzellen

Zieht man zum Vergleich der Zellsensitivitäten auch die Versuche mit HT29clone19a- und LT97-Zellen heran, welche nicht parallel durchgeführt wurden, sowie die an Primärzellen durchgeführte Untersuchungen, so ergeben sich die in Abbildung 33 dargestellten Ergebnisse. Die Zusammenfassung bestätigt zum einen die Versuchsergebnisse aus Abschnitt 4.2.5.1 und ermöglicht zum anderen eine vergleichende Betrachtung aller drei Zellmodelle. Da die TI-Werte in Abbildung 33 den Comet-Assay-Ergebnissen der Abschnitte 4.2.1 bis 4.2.3 entsprechen, wurden an dieser Stelle nur die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Zellmodellen kenntlich gemacht.

Vergleicht man die Sensitivität der Zellen nach Schädigung mit H_2O_2 , so ergaben sich signifikant höhere Schäden in den mit 150 μM H_2O_2 behandelten HT29clone19a- ($\text{TI} = 32,1 \pm 8,7 \%$) bzw. LT97-Zellen ($\text{TI} = 30,7 \pm 6,5 \%$), als in den primären Kolonzellen ($\text{TI} = 24,3 \pm 4,3 \%$). Darüber hinaus unterschieden sich die TI-Werte der mit 37,5 μM H_2O_2

geschädigten LT97- und Primärzellen voneinander. Hier waren die Schäden in den Primärzellen höher als in den LT97-Zellen (Abbildung 33 a).

Nach Hexenalschädigung zeigten die LT97-Zellen ein signifikant höheres Schädigungsniveau als die HT29clone19a- und die Primärzellen. Der Vergleich der Zellsensitivitäten zeigt, dass die LT97-Zellen gegenüber den HT29clone19a-Zellen nach Behandlung mit 800 μM , 1200 μM und 1600 μM Hexenal signifikant höhere DNS-Schäden aufwiesen. Vergleicht man die LT97-Zellen mit den primären Kolonzellen, so waren die Unterschiede nur für 1600 μM Hexenal signifikant. (Abbildung 33 b).

Auch nach HNE-Schädigung wiesen die LT97-Zellen mit einem TI-Wert von maximal $30,1 \pm 7,6 \%$ das höchste Schädigungsniveau der drei Zellmodelle auf, reagierten also am sensitivsten auf HNE. Im Vergleich zu den HT29clone19a-Zellen reagierten die LT97-Zellen bei allen vier HNE-Konzentrationen signifikant empfindlicher. Ebenso zeigten sich die LT97-Zellen sensibler als die primären Kolonzellen, wobei die Unterschiede hier für 200 μM und 250 μM HNE signifikant waren (Abbildung 33 c).

Vergleich der Kolonzellen

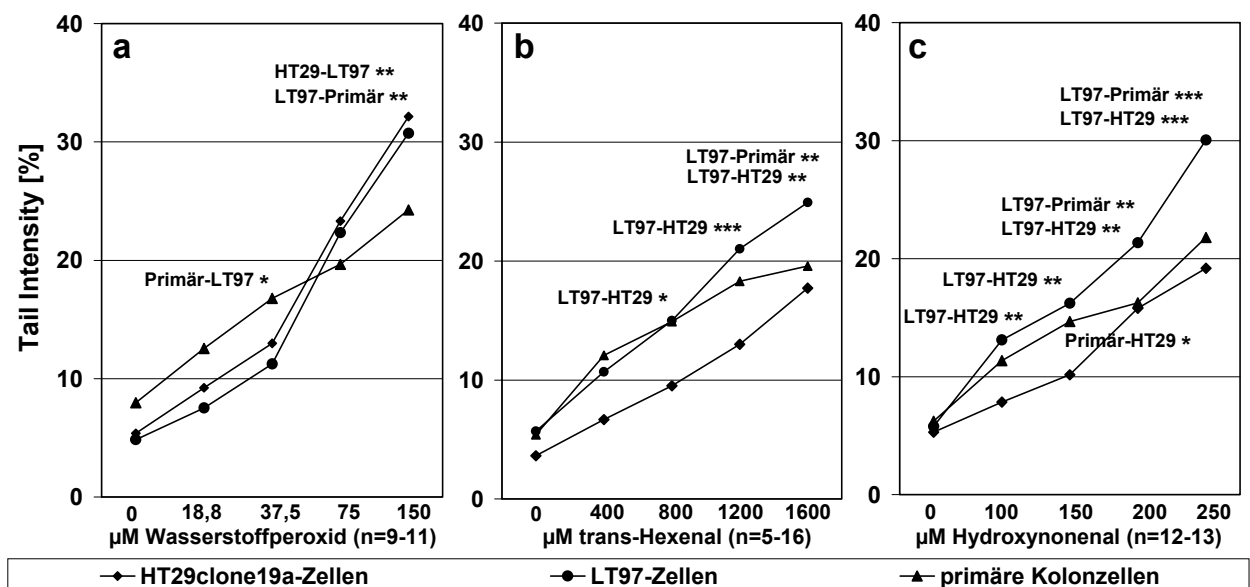


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der Sensitivitäten von HT29clone19a-, LT97- und primären Kolonzellen. Schädigung durch a) 0-150 μM H_2O_2 , b) 0-1600 μM Hexenal bzw. c) 0-250 μM HNE.

Angaben als $\text{MW} \pm \text{SD}$. Vergleich der Zellen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.6 Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf HNE-induzierte DNS-Schäden

Um den Einfluss des Lösungsmittels auf die HNE-induzierten Schäden zu überprüfen, wurde die genotoxische Wirkung von EtOH- bzw. DMSO-gelöstem HNE miteinander verglichen. Als Zellen wurden HT29clone19a- und primäre Kolonzellen verwendet, wobei sowohl die dosisabhängige Induktion von DNS-Schäden als auch die Reparatur HNE-induzierter Schäden

(diese nur in Primärzellen) in drei parallel durchgeführten Versuchen untersucht wurden. Bei Verwendung von DMSO als Lösungsmittel waren die HNE-induzierten Schäden in HT29clone19a-Zellen ab 250 μ M signifikant ($TI = 18,7 \pm 7,2 \%$), bei Verwendung von EtOH als Lösungsmittel ab 200 μ M ($TI = 15,6 \pm 4,5 \%$). Die induzierten Schäden zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des verwendeten Lösungsmittels (Abbildung 70 im Anhang III). Auch in den primären Kolonzellen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den getesteten Lösungsmitteln. In den Primärzellen induzierte HNE unabhängig vom Lösungsmittel ab 200 μ M signifikante DNS-Schäden, die bei $18,6 \pm 3,6 \%$ (DMSO) bzw. $15,5 \pm 2,8 \%$ (EtOH) lagen (Abbildung 71 in Anhang III).

Wie bei den Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhängen ließ sich auch bei den Reparaturversuchen in Primärzellen keine Lösungsmittelabhängigkeit der Ergebnisse feststellen. Die Reparatur der Schäden zeigte den bereits in den Abschnitten 4.2.1.2 und 4.2.2.2 beschriebenen Verlauf (ohne Abbildung).

4.2.7 Untersuchungen zur Reparatur HNE-induzierter DNS-Schäden: Quantifizierung von Propano-DNS-Addukten

Die Untersuchungen zur Reparatur HNE-induzierter DNS-Schäden in HT29clone19a- bzw. primären Kolonzellen ergaben einen nicht erwarteten Reparaturverlauf, da die im Comet-Assay quantifizierten TI-Werte innerhalb der ersten 60 min signifikant anstiegen und erst nach 60-120 min tendenziell abfielen. Um diesen Reparaturverlauf in den HNE-geschädigten Zellen zu erklären, wurden die Propano-dG-Addukte in HNE-behandelten primären Kolonzellen nach 0-120 min Reparatur von Kooperationspartnern am Institut für Toxikologie der Universität Würzburg quantifiziert. Für die Quantifizierung der Propano-dG-Addukte wurden die Primärzellen sowohl mit EtOH- als auch DMSO-gelöstem HNE behandelt und nach der Schädigung weitere 0-120 min bei 37°C inkubiert ($n = 3$). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 und 7 zusammengefasst. Es zeigt sich, dass die Propano-dG-Adduktmengen bereits in den Kontrollzellen sehr hoch waren ($78,7 \pm 36,5$ bis $170,7 \pm 82,4$ Addukte je 10^9 Nukleotide) und sich nicht signifikant von denen der HNE-geschädigten Zellen unterschieden ($93,3 \pm 66,6$ bis $223,0 \pm 91,9$ Addukte je 10^9 Nukleotide). Zudem war die Änderung der Adduktmengen während der zweistündigen Reparatur sehr uneinheitlich, so dass sich kein eindeutiger Trend erkennen ließ.

Tabelle 6: Übersicht über die durch Schädigung humaner Kolonprimärzellen mit 150 µM HNE (in DMSO gelöst) induzierten Propano-dG-Addukte [Addukte/ 10⁹ Nukleotide].

Substanz	DMSO	HNE	DMSO	HNE	DMSO	HNE	DMSO	HNE
Reparatur	0 min	0 min	30 min	30 min	60 min	60 min	120 min	120 min
Versuch 1	31	209	159	158	113	212	48	25
Versuch 2	100	145	142	108	134	251	69	97
Versuch 3	139	182	37	109	265	142	119	158
Mittelwert	90	179	113	125	171	202	79	93
SD	55	32	66	29	82	55	37	67

Behandlung primärer Kolonzellen mit 150 µM HNE, 0-120 min Nachinkubation. Die Propano-dG-Addukte wurden nach ³²P-Postlabeling mittels HPLC quantifiziert und sind als Addukte je 10⁹ Nukleotide angegeben.

Tabelle 7: Übersicht über die durch Schädigung humaner Kolonprimärzellen mit 150 µM HNE (in EtOH gelöst) induzierten Propano-dG-Addukte [Addukte/ 10⁹ Nukleotide].

Substanz	EtOH	HNE	EtOH	HNE	EtOH	HNE	EtOH	HNE
Reparatur	0 min	0 min	30 min	30 min	60 min	60 min	120 min	120 min
Versuch1	161	n.d.	131	70	95	281	86	37
Versuch2	109	288	230	150	83	191	178	170
Versuch3	199	158	105	298	83	174	101	77
Mittelwert	156	223	155	173	87	215	122	95
SD	45	92	66	116	7,0	58	49	68

Behandlung primärer Kolonzellen mit 150 µM HNE, 0-120 min Nachinkubation. Die Propano-dG-Addukte wurden nach ³²P-Postlabeling mittels HPLC quantifiziert und sind als Addukte je 10⁹ Nukleotide angegeben.

Da sich in den Propano-DNS-Adduktmengen kein Unterschied zwischen den Versuchsreihen mit EtOH- bzw. DMSO-gelöstem HNE feststellen ließ, wurden die Ergebnisse zusammengefasst und erneut statistisch ausgewertet. Auch nach Zusammenfassung der Versuche erreichten die Adduktkonzentrationen in den Kontrollzellen Werte, die denen der HNE-behandelten Zellen entsprachen ($100,2 \pm 45,4$ bis $134,0 \pm 63,5$ Addukte je 10⁹ Nukleotide (Kontrollen); $94,0 \pm 60,3$ bis $208,5 \pm 51,0$ Addukte je 10⁹ Nukleotide (HNE-behandelte Zellen)). Zwischen den unbehandelten und den HNE-behandelten Zellen war zu keiner Zeit der 120 minütigen Reparaturphase ein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen, so dass die signifikante Abnahme der Adduktmengen in den HNE-behandelten Zellen zwischen 0 min bzw. 60 min und 120 min von $196,4 \pm 56,7$ bzw. $208,5 \pm 51,0$ Addukte je 10⁹ Nukleotide auf $94,0 \pm 60,3$ Addukte je 10⁹ Nukleotide nicht aussagekräftig ist (Abbildung 72 in Anhang III).

4.2.8 Untersuchung H₂O₂- bzw. HNE induzierter Schäden im alkalischen und neutralen Comet-Assay

Während mit dem alkalischen Comet-Assay alkalilabile Stellen, DNS-Strangbrüche (Doppel- und Einzelstrangbrüche), Crosslinks und Exzisionsreparaturstellen erfasst werden, spiegelt die DNS-Migration im neutralen Comet-Assay nur DNS-Doppelstrangbrüche und -Crosslinks wider. So erlaubt die Wahl des pH-Wertes bei DNS-Entwindung und Elektrophorese substanzinduzierte Schäden differenziert zu erfassen. Um die durch H₂O₂ bzw. HNE induzierten Schäden genauer zu charakterisieren, wurden HT29clone19a-Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert und die DNS-Schäden sowohl im alkalischen als auch im neutralen Comet-Assay quantifiziert. Für den

alkalischen Comet-Assay betrug der pH-Wert des Elektrophoresepuffers 13, für den neutralen Comet-Assay 8 (Abbildung 34 und 35) (n=3).

Sowohl im alkalischen als auch im neutralen Comet-Assay induzierte H_2O_2 in den HT29clone19a-Zellen dosisabhängige Schäden. Diese waren bei alkalischer Elektrophorese ab einer Konzentration von 75 μM H_2O_2 ($25,4 \pm 9,5$ %) signifikant, bei neutraler Elektrophorese nur bei 150 μM H_2O_2 ($20,5 \pm 2,8$ %). Die TI-Werte verringerten sich tendenziell vom alkalischen zum neutralen Comet-Assay, doch ließen sich die Unterschiede nicht statistisch sichern (Abbildung 34).

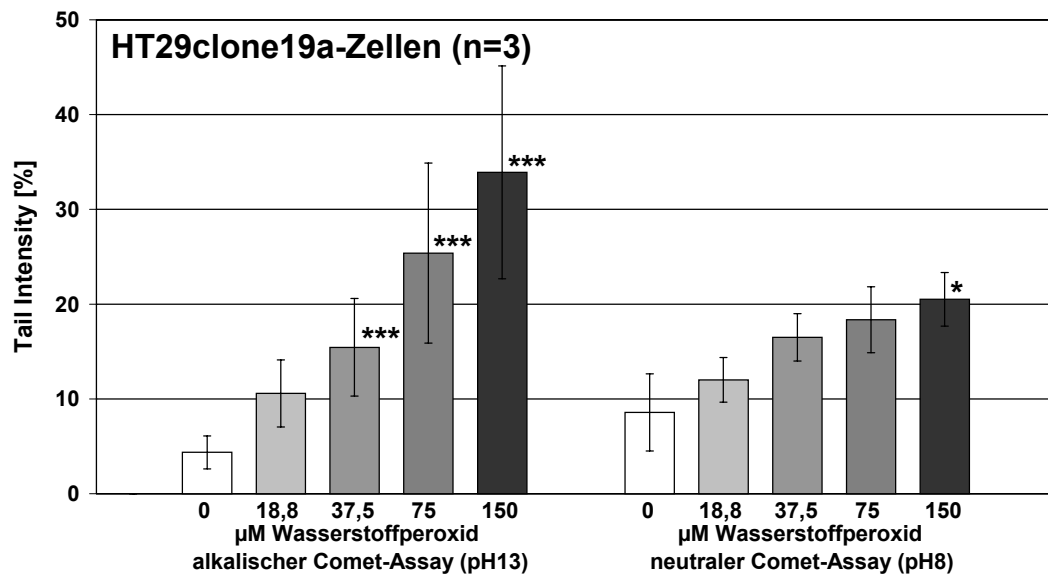


Abbildung 34: Charakterisierung der durch 0-150 μM H_2O_2 in HT29clone19a-Zellen induzierten DNS-Schäden im alkalischen bzw. neutralen Comet-Assay.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die in den HT29clone19a-Zellen durch HNE induzierten Schäden waren bei alkalischer Elektrophorese ab 200 μM signifikant. Bei neutraler Elektrophorese unterschieden sich die TI-Werte hingegen nicht von denen der Kontrollzellen. Der Vergleich von alkalischem und neutralem Comet-Assay erbrachte für die beiden höchsten HNE-Konzentrationen statistisch signifikante Unterschiede, wobei die TI-Werte nach Behandlung der Zellen mit 200 μM HNE bei $17,6 \pm 4,7$ % bzw. $6,3 \pm 2,6$ % und nach 250 μM HNE bei $20,6 \pm 6,7$ % bzw. $7,2 \pm 2,9$ % lagen (Abbildung 35).

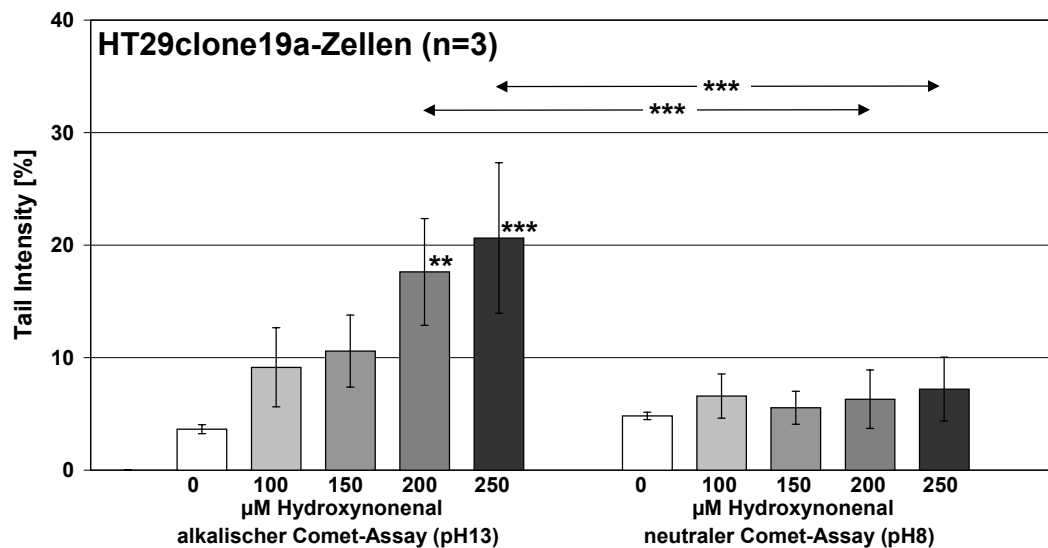


Abbildung 35: Charakterisierung der durch 0-250 µM HNE in HT29clone19a-Zellen induzierten DNS-Schäden im alkalischen bzw. neutralen Comet-Assay.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der TI-Werte in alkalischem und neutralem Comet-Assay: *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.2.9 Untersuchung des Einflusses der Zellwachstumsdauer auf Hexenal-induzierte DNS-Schäden

Bei Arbeiten mit Zelllinien stellt sich generell die Frage, ob die Zeit zwischen Zellaussaat und -ernte die Sensitivität der Zellen beeinflusst. Um diesen Einfluss der Wachstumsdauer auf die im Comet-Assay gewonnenen Ergebnisse zu untersuchen, wurden HT29clone19a-Zellen zum gleichen Zeitpunkt ausgesät, 24 h, 48 h oder 72 h wachsen gelassen und mit 400 µM Hexenal behandelt. Die induzierten DNS-Schäden wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min und $t = 30$ min quantifiziert (Abbildung 36; $n = 3$). Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wiesen die nach 24 h, 48 h bzw. 72 h geernteten Zellen signifikante DNS-Schäden auf, die auch nach 30 min Reparatur z. T. noch signifikant waren. Die nach 24 h, 48 h bzw. 72 h gemessenen TI-Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Wachstumsdauer der Zellen hatte keinen Einfluss auf die Höhe der Hexenal-induzierten DNS-Schäden.

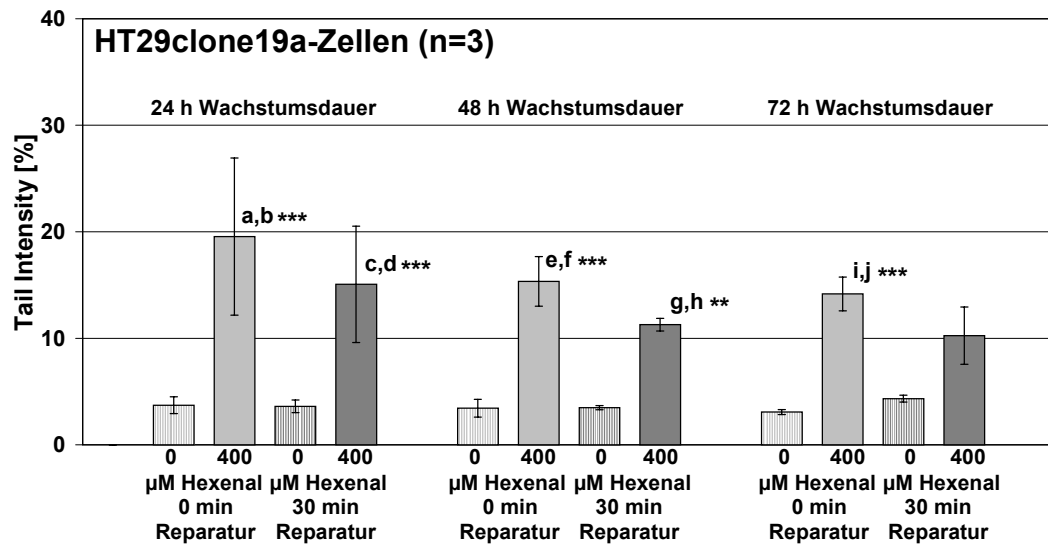


Abbildung 36: Einfluss der Wachstumsdauer der Zellen auf die im Comet-Assay gemessenen DNS-Schäden. Schädigung von HT29clone19a-Zellen mit 400 µM Hexenal (0-30 min Reparatur).

Angaben als MW \pm SD. a,b ***: Behandlung versus Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0 min nach 24 h Wachstumsdauer; c,d ***: Behandlung versus Kontrolle zum Zeitpunkt t = 30 min nach 24 h Wachstumsdauer; e,f ***: Behandlung versus Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0 min nach 48 h Wachstumsdauer; g,h **: Behandlung versus Kontrolle zum Zeitpunkt t = 30 min nach 48 h Wachstumsdauer; i,j ***: Behandlung versus Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0 min nach 72 h Wachstumsdauer. ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.3 Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH

Für die Comet-FISH-Versuche wurden primäre Kolonzellen und LT97-Kolonadenomzellen mit H₂O₂, Hexenal bzw. HNE behandelt und mit DNS-Sonden für das *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-Gen hybridisiert. Die HT29clone19a-Zellen eigneten sich aufgrund ihres hyperdiploiden Chromosomensatzes nicht für die Comet-FISH-Versuche und wurden dementsprechend nicht in die Untersuchungen einbezogen. Aus der Kombination der beiden Zellsysteme (primäre Kolonzellen und LT97-Kolonadenomzellen), mit den drei Testsubstanzen (H₂O₂, Hexenal und HNE) und den drei Gensonden ergaben sich für die Comet-FISH-Versuche 18 Versuchsreihen, die jeweils drei- bis viermal wiederholt wurden (Tabelle 8). Dabei wurden für einen einzelnen Versuch fünf mit der jeweiligen Gensonde hybridisierte OT ausgewertet (Lösungsmittelkontrolle und vier verschiedene Substanzkonzentrationen).

Tabelle 8: Tabellarische Übersicht über die Comet-FISH-Versuche (ohne Zwei- bzw. Drei-Farben-FISH-Versuche).

	Primäre Kolonzellen			LT97-Kolonadenomzellen		
	H ₂ O ₂ (0-150 µM)	Hexenal (0-1600 µM)	HNE (0-250 µM)	H ₂ O ₂ (0-150 µM)	Hexenal (0-1600 µM)	HNE (0-250 µM)
<i>APC</i>	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
<i>KRAS</i>	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3	n = 3
<i>TP53</i>	n = 3	n = 3	n = 4	n = 3	n = 4	n = 3

4.3.1 Karyotypisierung der HT29clone19a- und LT97-Zellen

Die Auswertung der genspezifischen Schäden mittels Comet-FISH beruht auf der Anzahl und Lage der fluoreszierenden Gensonden in den untersuchten Zellen. Dabei sollten bei diploidem

Chromosomensatz für jedes Gen zwei Hybridisierungssignale in der Zelle vorliegen, bei Bruch einer Sonde auch drei Signale. Um diese theoretische Anzahl an Signalen in jeder Zelle zu haben, war ein stabiler, diploider Karyotyp eine wesentliche Voraussetzung für die Comet-FISH-Untersuchungen. Während bei den aus gesundem Kolongewebe isolierten Primärzellen davon ausgegangen werden konnte, dass ein diploider Karyotyp vorlag, war der Karyotyp der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien nicht bekannt.

4.3.1.1 HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen

Die von Kooperationspartnern durchgeführte Karyotypisierung der HT29clone19a-Zellen ergab einen heterogenen hyperdiploiden Karyotyp, der viele Trisomien aufwies. Die Chromosomenanzahl der einzelnen Zellen lag zwischen 64 und 69, wobei eine große Variation zwischen den einzelnen Metaphasenkernen festgestellt wurde [Kuechler et al, 2003]. Auch die im Rahmen dieser Arbeit interessierenden Chromosomen 5, 12 und 17 lagen in unterschiedlicher Anzahl in den Zellen vor, so dass sich die HT29clone19a-Zellen nicht für die Comet-FISH-Versuche eigneten. Das Falschfarbendarstellung einer Metaphase der HT29clone19a-Zelllinie ist im Anhang III in Abbildung 73 zu sehen. Der Karyotyp der HT29clone19a-Zellen ergab sich, nach Auswertung von zehn Metaphasen, wie folgt:

64-69,XX,del(X)(p11.2),-1,del(1)(p35),+der(2)t(1;2)(q32;q11),-
3,3,i(3)(q10),der(3)ins(3;12)(p12;p12p12),-
4,der(4)t(2;4)(q35;q11),+der(5)t(5;6)(q11;q26),+der(5)t(5;19)(q11;q11),-
6,der(6;9)t(6;9;X;9)(6pter6q10:9q109q21:Xp21.1Xp11.3:9q219qter),-
7,del(7)(p15),+idic(7)(q11.2),-8,-8,der(8)i(8)(qterq10:q10q24:hsr:q24qter),-
9,+del(11)(p13),+der(11)t(11;20)(q24;q11.2),-13,-13,-
13,i(13)(q10),i(13)(q10),der(13)i(13)(q10)t(5;13)(q31;q21),-14,-16,del(16)(q13),-
17,der(17)t(17;19)(p11;p11),-18,i(18)(p10),-19,-19,+20,-21,+der(22)t(17;22;17)[cp10].

4.3.1.2 LT97-Kolonadenomzellen

Die Karyotypisierung der 1997 etablierten LT97-Kolonadenomzelllinie durch die Kooperationspartner ergab, dass die Zelllinie aus zwei Klonen bestand, die im Verhältnis 1:1 vorlagen. Beide Klone wiesen eine Translokation zwischen Chromosom 7 und 17 und ein verändertes Chromosom 1 auf. Der eine Klon besaß ein Isochromosom 1q, der andere Klon eine dizentrische Translokation des langen Arms von Chromosom 1 und 18. In Summe wiesen die LT97-Zellen jedoch einen relativ stabilen Chromosomensatz mit 46-50 Chromosomen je Zelle und eine sehr geringe Intermetaphasenvariation auf [Schaeferhenrich et al., 2003b]. Der Karyotyp blieb, nach bisherigen Erkenntnissen, auch bei höheren Passagen unverändert stabil [Kuechler et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Aufgrund des beinahe diploiden Chromosomensatzes und da die im Rahmen dieser Arbeit interessierenden Chromosomen 5, 12

und 17 nicht von chromosomalen Aberrationen betroffen waren, wurden die LT97-Zellen, neben primären humanen Kolonzellen, für die Comet-FISH-Versuche verwendet. Die Metaphasen der beiden LT97-Klone sind als Falschfarbendarstellungen im Anhang III, Abbildung 74 gezeigt. Gemäß ISCN [Mitelman, 1995] ergab sich der Karyotyp der LT97-Zellen wie folgt:

46~50,XX,+i(1)(q10),+der(7)t(7;17)(q31.3;q21.3)[cp15]/44~46,XX,+dic(1;18)t(q10:qter;q10:qter),der(7)t(7;17)(q31.3;q21.3),-18 [cp14].

4.3.2 Generelle DNS-Schäden in den Comet-FISH-Versuchen

Die generellen DNS-Schäden wurden bei der Comet-FISH-Auswertung erfasst, indem die ausgewerteten Zellen Schädigungsklassen von 1-4 zugeordnet wurden, wobei 1 für ungeschädigte Zellen, 2 für leichtgeschädigte, 3 für mittelschwergeschädigte und 4 für schwergeschädigte Zellen stand. Zellen, die den vier Schädigungskategorien entsprechen, sind beispielhaft in Abbildung 37 dargestellt.

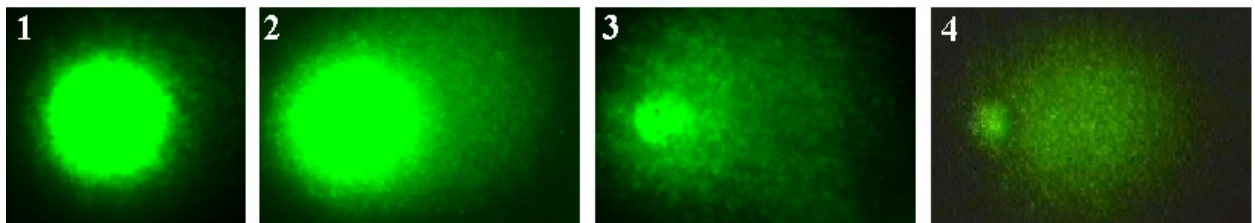


Abbildung 37: Zuordnung der Zellen zu den vier Schädigungskategorien. Beispielhaft sind H₂O₂-geschädigte Zellen abgebildet, die den Kategorien 1, 2, 3 bzw. 4 entsprechen.

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera.

Zur Auswertung der generellen DNS-Schäden in den Comet-FISH-Versuchen wurden jeweils die Versuche zusammengefasst, in denen die Primär- bzw. LT97-Zellen mit H₂O₂, Hexenal oder HNE geschädigt worden waren (n = 9-10). Die Zuordnung der Zellen zu den vier Schädigungskategorien wurde als Säulendiagramme dargestellt, wobei die Gesamtzahl der in einem Konzentrationsbereich ausgewerteten Zellen gleich 100 % gesetzt wurde. Da bei dieser Darstellung die Standardabweichungen nicht kenntlich gemacht werden konnten, sind die Ergebnisse zusätzlich in tabellarischer Form (MW ± SD) im Anhang II (Tabelle 16 bis 21) aufgeführt.

Sowohl nach Schädigung mit H₂O₂ (Abbildung 38) als auch nach Schädigung mit Hexenal bzw. HNE (Abbildung 39 und 40) wurden die durch höhere Substanzkonzentrationen induzierten größeren Schäden an der Gesamt-DNS deutlich. Während bei den Lösungsmittelkontrollen die meisten Zellen den Schädigungskategorien 1 und 2 zugeordnet wurden, lagen sie bei den höchsten Substanzkonzentrationen in den Kategorien 3 und 4. So befanden sich nach Schädigung mit 150 µM H₂O₂ 54,9 % der primären Kolonzellen und 53,9 % der LT97-Zellen in den Kategorien 3 und 4. Nach Schädigung mit 1600 µM Hexenal fielen 60,5 % (Primärzellen) bzw.

68,7 % (LT97-Zellen) und nach Schädigung mit 250 μM HNE 59,3 % (Primärzellen) bzw. 62,8 % (LT97-Zellen) der Zellen in die Kategorien 3 und 4.

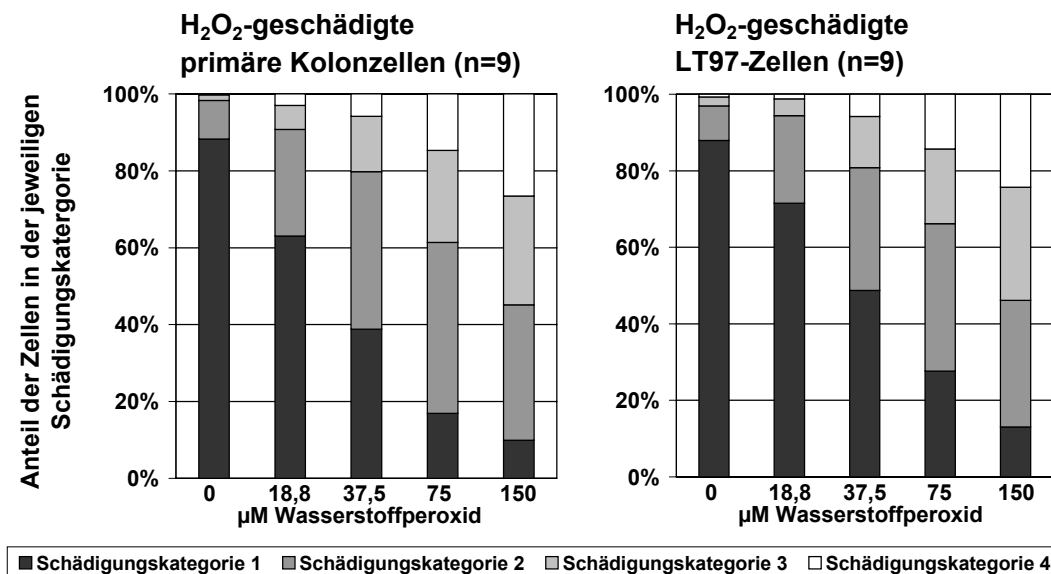


Abbildung 38: H₂O₂-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.
Angaben als MW.

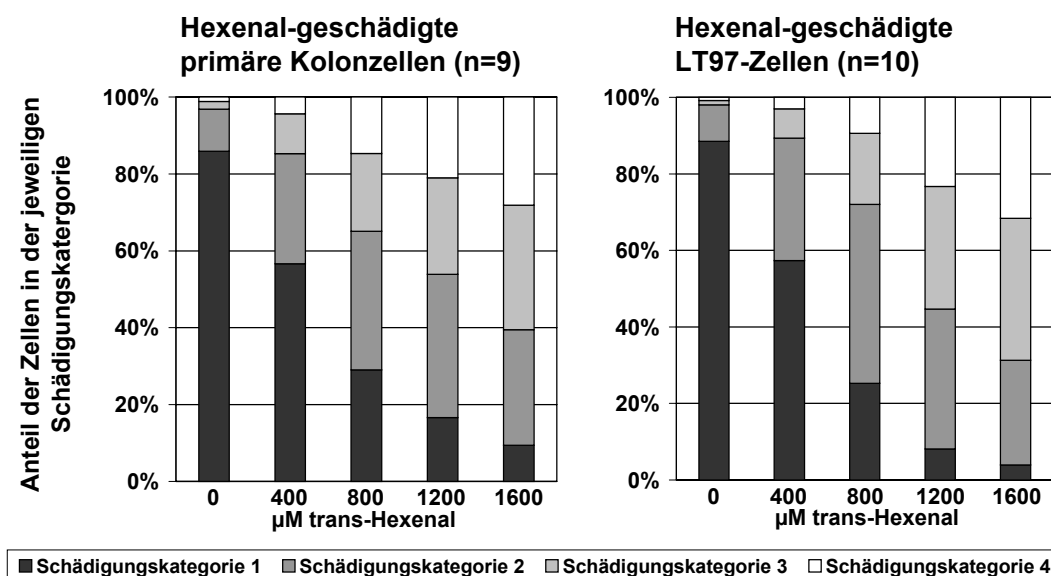


Abbildung 39: Hexenal-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.
Angaben als MW.

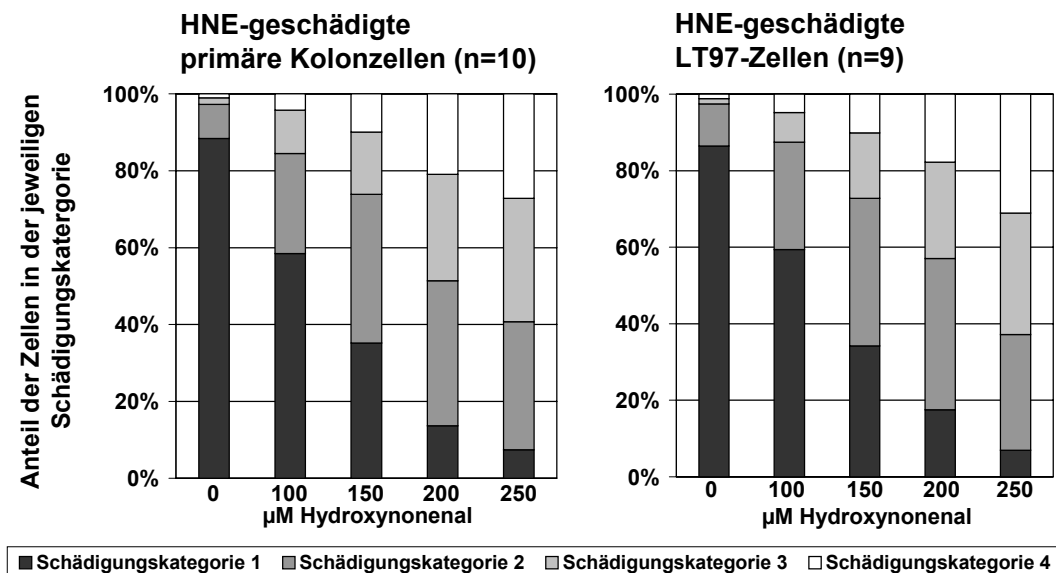


Abbildung 40: HNE-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: prozentuale Anteile der Zellen in den Schädigungskategorien 1-4.

Angaben als MW.

4.3.3 Hybridisierungseffizienz in den Comet-FISH-Versuchen

Bei der Auswertung der Comet-FISH-Versuche wurden sowohl die Zellen mit den erwarteten zwei Signalen ausgezählt, als auch die nicht bzw. schlecht hybridisierten Zellen mit keinem bzw. nur einem Signal. Aus der Anzahl der Zellen mit zwei Hybridisierungssignalen und der Gesamtzahl ausgewerteter Zellen, ließ sich die Hybridisierungseffizienz berechnen. Diese lag für die durchgeführten Versuche bei durchschnittlich $81,9 \pm 3,6 \%$, d. h. $> 80 \%$ der Zellen wiesen die theoretisch erwarteten 2 Signale auf. Für die einzelnen Sonden differierte die Hybridisierungseffizienz nur geringfügig und betrug für das *APC*-Gen $83,8 \pm 2,7 \%$, für das *KRAS*-Gen $81,0 \pm 2,7 \%$ und für das *TP53*-Gen $80,9 \pm 4,6 \%$. Die Hybridisierungseffizienz der einzelnen Versuche ist als MW \pm SD tabellarisch im Anhang II dargestellt (Tabelle 22 bis 27).

4.3.4 Lokalisierung der FISH-Signale innerhalb der Zellen

Die genspezifischen Schäden wurden erfasst, indem die Lage der Fluoreszenzsignale in den Zellen ausgewertet wurde. Dabei konnten beide Signale im Kometenkopf, ein Signal im Kometenkopf und eines im -schweif oder beide Signale im Kometenschweif liegen. In Abbildung 41 sind beispielhaft HNE-geschädigte primäre Kolonzellen dargestellt, die die unterschiedliche Lokalisierung der Hybridisierungssignale verdeutlichen.

Die Ergebnisse für die einzelnen Versuche ($n = 3-4$) sind im Anhang II tabellarisch zusammengefasst (MW \pm SD), wobei der prozentuale Anteile an Zellen angegeben ist, die beide Signale im Kometenkopf, ein Signal im Kometenkopf und eines im -schweif bzw. beide Signale im Kometenschweif aufwiesen (Tabelle 28 bis 45).

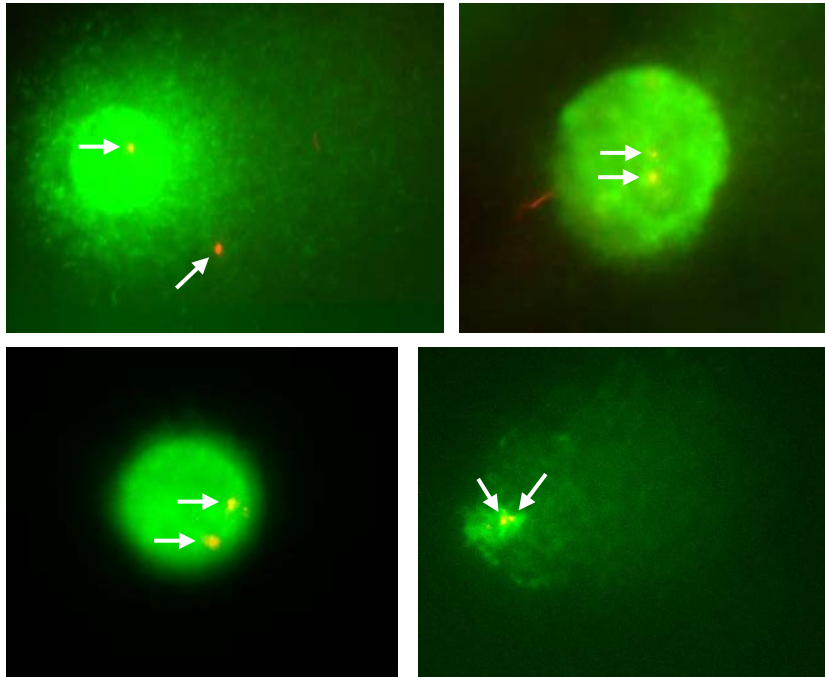


Abbildung 41: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in Kometenkopf und/ oder Kometenschweif.

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera. In den Abbildungen sind die Hybridisierungssignale jeweils durch Pfeile kenntlich gemacht.

4.3.5 Spezifische Schäden im *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-Gen

Im Rahmen der weitergehenden FISH-Auswertung wurde für jede Substanzkonzentration berechnet, wie viel Prozent der jeweiligen Gen-Sonden im Kometenschweif lagen. Es zeigte sich, dass die Hybridisierungssignale mit stärkerer DNS-Schädigung vermehrt in den Kometenschweif auswanderten und sich dadurch für die genspezifischen Schäden, ähnlich wie für die generellen DNS-Schäden im Comet-Assay, Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge ergaben. Um die spezifische Schadwirkung der Testsubstanzen im *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-Gen zu erfassen, wurden diese genspezifischen Schäden den generellen Schäden an der Gesamt-DNS gegenübergestellt. Konkret wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Gen-Sonde im Kometenschweif mit dem prozentualen Anteil der Gesamt-DNS im Kometenschweif (Tail Intensity) verglichen. Auf die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wird im Folgenden näher eingegangen.

4.3.5.1 Primäre Kolonzellen

Die Comet-FISH-Untersuchungen zu *APC*-spezifischen Schäden in primären Kolonzellen ergaben für alle drei Substanzen gute Konzentrationsprofile (Abbildung 42 bis 44) Nach H_2O_2 -Schädigung waren die *APC*-Signale ab einer Konzentration von $75 \mu\text{M}$ signifikant in den Kometenschweif ausgewandert, wobei $25,3 \pm 6,9 \%$ ($75 \mu\text{M}$) bzw. $28,8 \pm 9,7 \%$ ($150 \mu\text{M}$) der Signale im Kometenschweif geschädigter Zellen lagen (Abbildung 42; $n = 3$). Vergleicht man die Comet-FISH-Ergebnisse mit den dazugehörigen Comet-Assay-Ergebnissen, so finden sich in den H_2O_2 -behandelten Primärzellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den *APC*-spezifischen Schäden und den Schäden an der Gesamt-DNS.

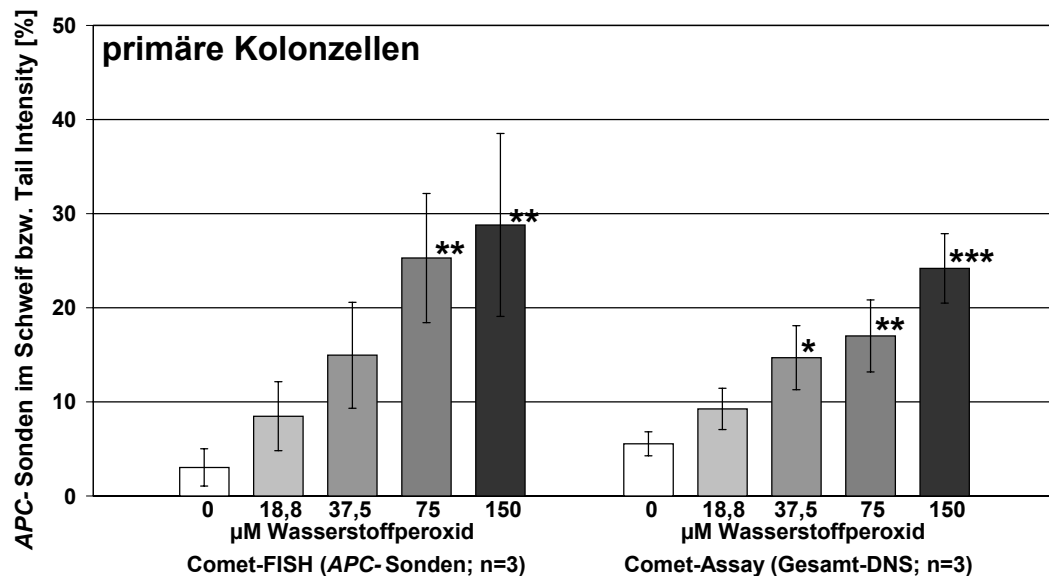


Abbildung 42: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Auch nach Hexenalbehandlung der primären Kolonzellen ergab sich ein guter Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang für das APC (Abbildung 43; $n = 3$). Die genspezifischen Schäden waren ab 800 μM Hexenal signifikant und es befanden sich durchschnittlich $18,0 \pm 3,8\%$ (800 μM Hexenal), $23,7 \pm 4,4\%$ (1200 μM Hexenal) bzw. $32,0 \pm 2,2\%$ (1600 μM Hexenal) der APC-Sonden im Kometenschweif. Nach Hexenalschädigung zeigten sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den mittels Comet-FISH gemessenen genspezifischen Schäden und den mittels Comet-Assay quantifizierten Schäden in der Gesamt-DNS. So wanderte das APC-Gen nach Schädigung der Primärzellen mit 1600 μM Hexenal gegenüber der Gesamt-DNS signifikant häufiger in den Kometenschweif aus.

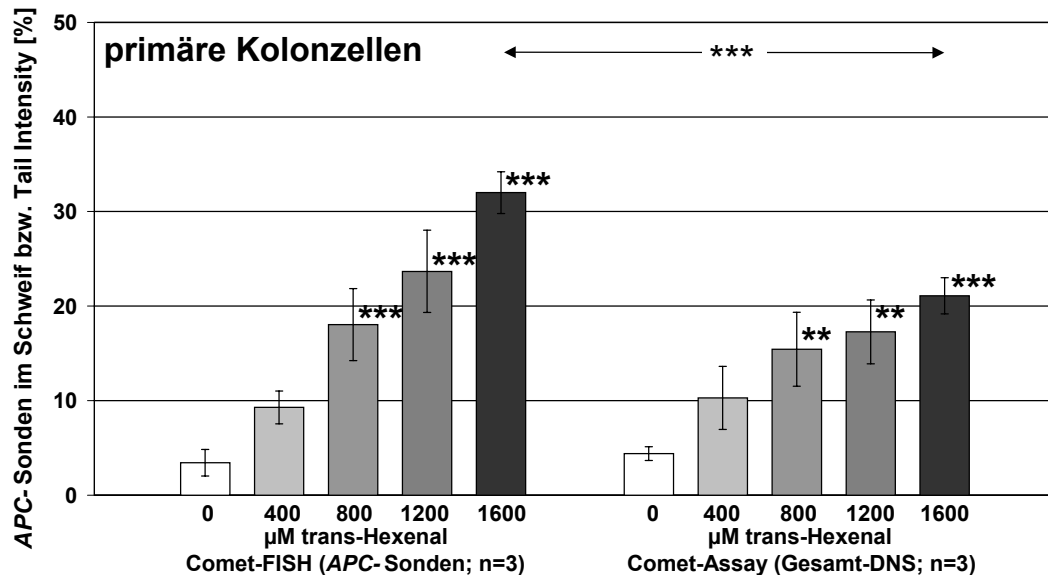


Abbildung 43: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *APC*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Behandlung der primären Kolonzellen mit HNE führte ebenfalls zu einer dosisabhängigen Auswanderung der *APC*-Signale in den Kometenschweif geschädigter Zellen. In Abbildung 44 (n = 3) ist zu erkennen, dass HNE ab einer Konzentration von 150 µM signifikante genspezifische DNS-Schäden setzte ($20,4 \pm 5,9$ %). Von 200 µM zu 250 µM HNE stieg der Anteil der DNS-Sonden im Schweif von $27,0 \pm 5,2$ % auf $36,5 \pm 5,3$ % an. Verglichen mit der Gesamt-DNS befanden sich die Fluoreszenzsignale der *APC*-Sonden häufiger im Kometenschweif, wobei diese vermehrte Auswanderung für 250 µM HNE signifikant war.

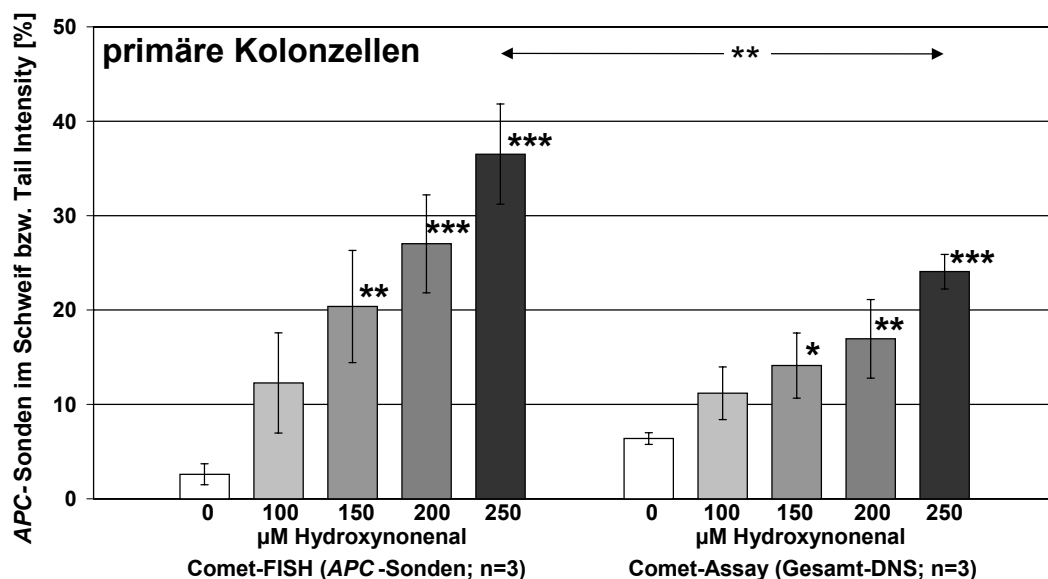


Abbildung 44: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *APC*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: ** $p < 0,01$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Comet-FISH-Versuche mit *KRAS*-Sonden wurden ebenfalls in H₂O₂-, Hexenal- und HNE-geschädigten Primärzellen durchgeführt (Abbildung 45 bis 47). Auch bei der Verwendung von *KRAS*-Sonden ergaben sich in H₂O₂-geschädigten Primärzellen gute Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge (n = 3), wobei bereits eine Konzentration von 37,5 µM H₂O₂ zu einer signifikanten Auswanderung der Hybridisierungssignale in den Kometenschweif führte (16,5 ± 2,1 %). Die genspezifischen Schäden stiegen mit höheren H₂O₂-Konzentrationen weiter an und lagen nach Schädigung mit 150 µM H₂O₂ bei 30,7 ± 6,8 %. Verglichen mit den im Comet-Assay nach H₂O₂-Schädigung der Primärzellen erhaltenen Ergebnissen, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Auswanderung der *KRAS*-Sonden und den Schäden in der Gesamt-DNS (Abbildung 45).

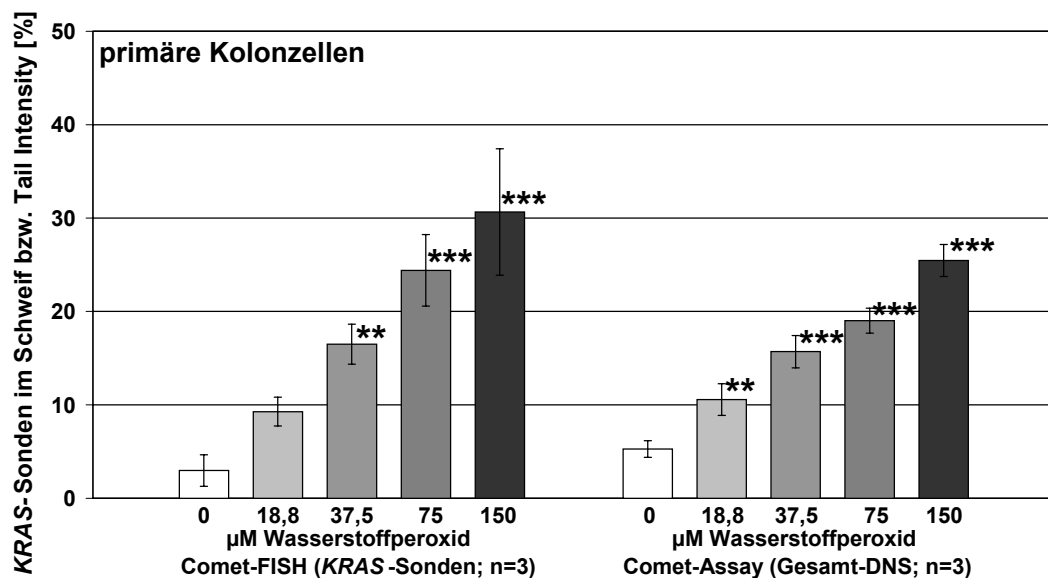


Abbildung 45: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW ± SD. Behandlung versus Kontrolle: ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In Hexenal-geschädigten Primärzellen (Abbildung 46; n = 3) lag das *KRAS*-Gen ab einer Konzentration von 800 µM Hexenal signifikant im Kometenschweif vor (22,1 ± 4,5 %). Die genspezifische Schädigung nahm auch hier mit steigender Konzentration weiter zu und erreichte bei 1600 µM einen Wert von 31,8 ± 2,5 %. Bei 1600 µM Hexenal wanderten die *KRAS*-Sonden stärker in den Kometenschweif als die Gesamt-DNS.

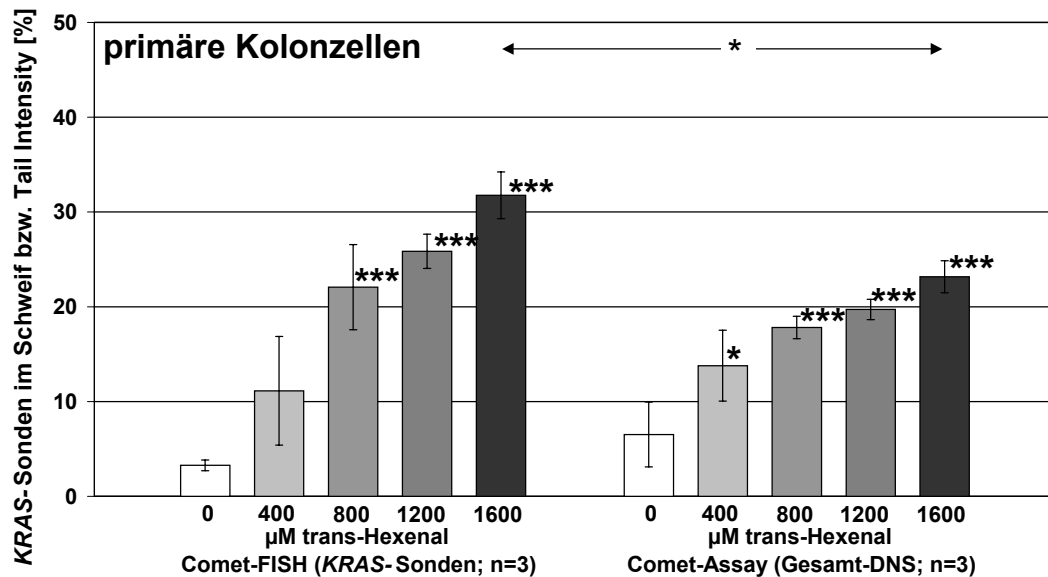


Abbildung 46: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: * $p < 0,05$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Comet-FISH-Versuchen mit *KRAS* ergaben auch für die HNE-behandelten Primärzellen dosisabhängige Effekte (Abbildung 47; $n = 3$). So induzierten 150 μM HNE in den primären Kolonzellen *KRAS*-spezifische Schäden, wobei $22,7 \pm 2,2$ % der Sonden im Kometenschweif vorlagen. Die Schäden stiegen mit höherer Schädigungskonzentration weiter an, und nach 250 μM HNE lagen $33,5 \pm 4,9$ % der Hybridisierungssignale im Kometenschweif. Vergleicht man die *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der Gesamt-DNS, so fanden sich für 150 μM , 200 μM und 250 μM HNE signifikante Unterschiede. Die *KRAS*-Sonden wanderten im Vergleich zur Gesamt-DNS vermehrt in den Kometenschweif aus.

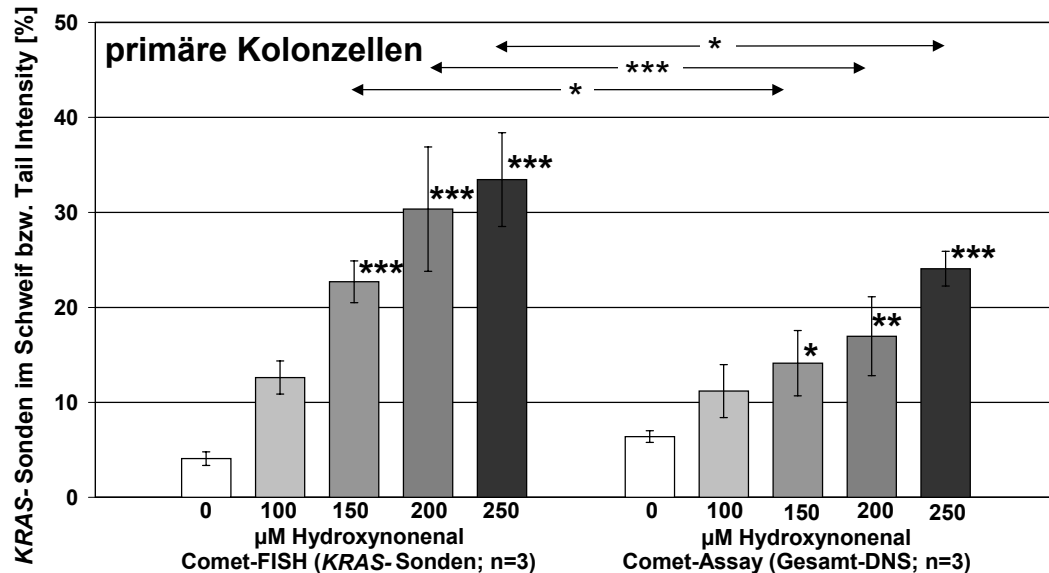


Abbildung 47: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Comet-FISH-Ergebnisse in primären Kolonzellen unter Verwendung von *TP53*-Sonden sind in den Abbildungen 48 bis 50 zusammengefasst. Die *TP53*-spezifischen Schäden waren in H_2O_2 -geschädigten Primärzellen ab einer Konzentration von $37,5 \mu M$ signifikant ($14,1 \pm 6,5 \%$). Insgesamt erhielt man einen deutlichen Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang, wobei die genspezifischen Schäden bis auf einen Wert von $42,7 \pm 2,2 \%$ ($150 \mu M H_2O_2$) anstiegen. Vergleicht man die Comet-FISH-Versuche mit den dazugehörigen Comet-Assay-Ergebnissen, so ergeben sich statistisch signifikante Unterschiede. Sowohl nach Schädigung mit $75 \mu M$ als auch mit $150 \mu M H_2O_2$ wanderten die *TP53*-Signale stärker als die Gesamt-DNS in den Kometenschweif aus (Abbildung 48; $n = 3$).

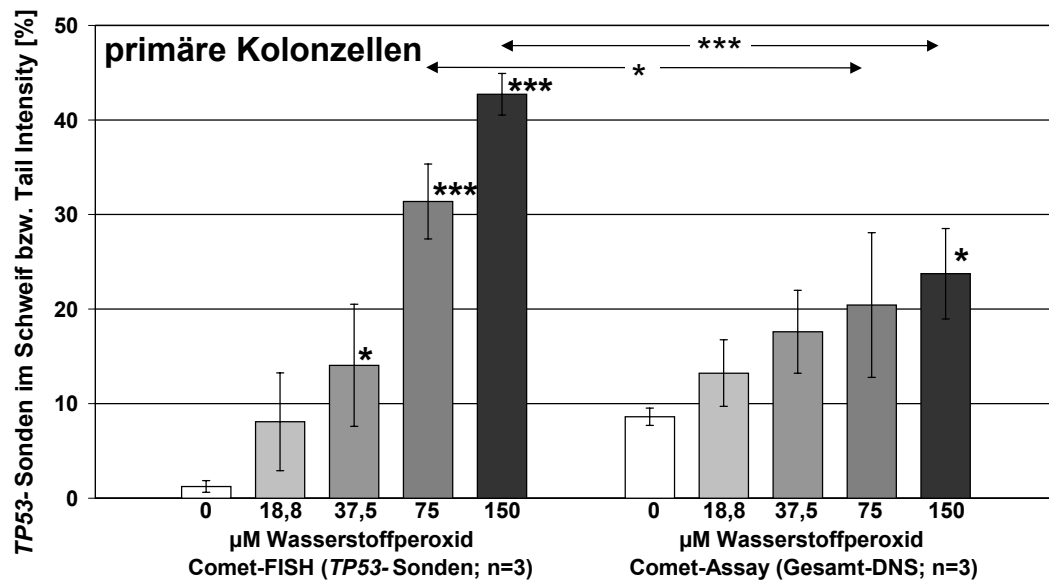


Abbildung 48: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Hexenal-induzierten TP53-Schäden (Abbildung 49; $n = 3$) waren ab einer Hexenalkonzentration von 800 μM signifikant und lagen hier bei $28,1 \pm 9,4$ %. Die genspezifischen Schäden stiegen mit höheren Konzentrationen weiter an und erreichten bei 1600 μM Hexenal einen Wert von $41,7 \pm 8,4$ %. Verglichen mit der Gesamt-DNS wanderten die TP53-Signale in den Hexenal-geschädigten Primärzellen verstärkt in den Kometenschweif aus. Der Unterschied erwies sich für 800 μM , 1200 μM und 1600 μM Hexenal als statistisch signifikant.

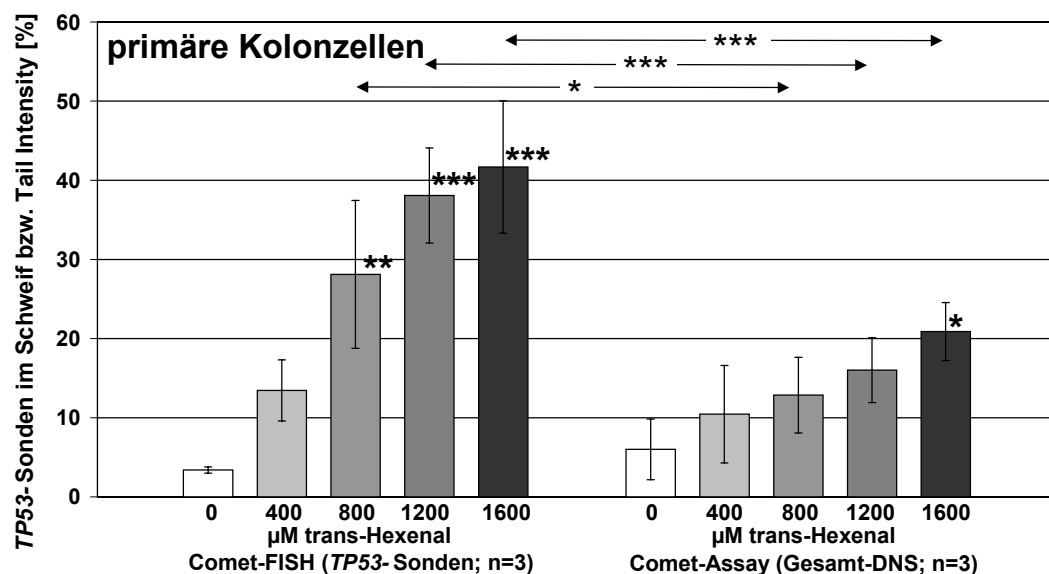


Abbildung 49: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

HNE-geschädigte Primärzellen wurden in vier Versuchen mit *TP53*-Sonden hybridisiert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 50 zusammengefasst und zeigen, dass die *TP53*-spezifischen Schäden nach Behandlung der Zellen mit 150 μM HNE signifikant waren. Dabei waren $18,6 \pm 3,2 \%$ der *TP53*-Sonden in den Kometenschweif ausgewandert. Der Anteil der Signale im Schweif nahm mit der HNE-Konzentration weiter zu und lag schließlich bei $47,8 \pm 8,5 \%$ (250 μM). Im Vergleich zur Gesamt-DNS wanderten die *TP53*-Sonden vermehrt in den Kometenschweif aus, wobei der Effekt sowohl für 200 μM als auch für 250 μM HNE hoch signifikant war.

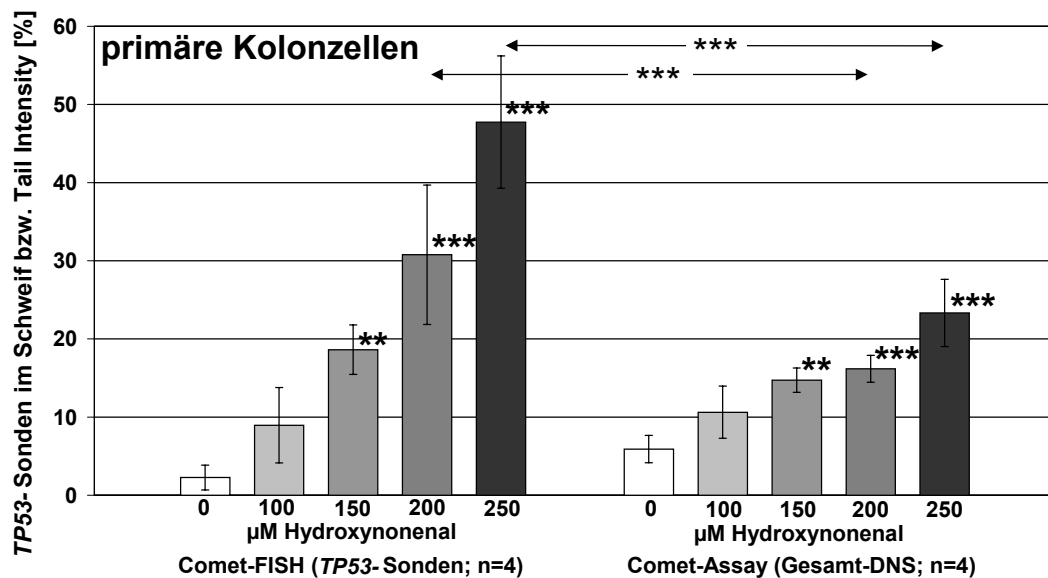


Abbildung 50: HNE-geschädigte Primärzellen: Vergleich der *TP53*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.3.5.2 LT97-Kolonadenomzellen

Auch in den LT97-Zellen wurden für jede Testsubstanz Comet-FISH-Versuche unter Verwendung von *APC*-Sonden durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 51 bis 53 dargestellt ($n = 3$). Die Schädigung der Zellen mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen führte zu einer dosisabhängigen Auswanderung der *APC*-Hybridisierungssignale in den Kometenschweif. Dieser Effekt war nach Schädigung mit 75 μM bzw. 150 μM H_2O_2 statistisch signifikant, wobei sich $29,8 \pm 8,4 \%$ bzw. $38,9 \pm 5,2 \%$ der Signale im Schweif befanden. Im Vergleich zu den im Comet-Assay gemessenen TI-Werten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 51).

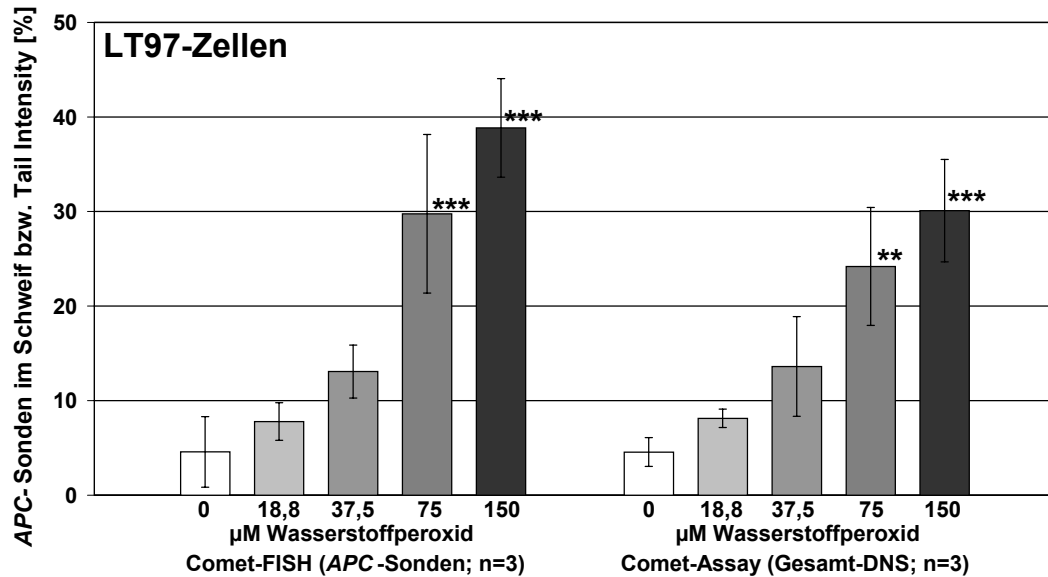


Abbildung 51: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *APC*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Nach Schädigung der LT97-Zellen mit Hexenal unterschieden sich die genspezifischen Schäden ab einer Konzentration von 800 μ M signifikant von der DMSO-Kontrolle. Die Schäden im *APC* stiegen mit höherer Konzentration weiter an und nach Schädigung mit 1600 μ M Hexenal waren $33,2 \pm 7,8$ % der Signale in den Schweif ausgewandert. Vergleicht man in den Hexenal-geschädigten LT97-Zellen die Auswanderung des *APCs* mit der der Gesamt-DNS, so ergaben sich keine Unterschiede (Abbildung 52).

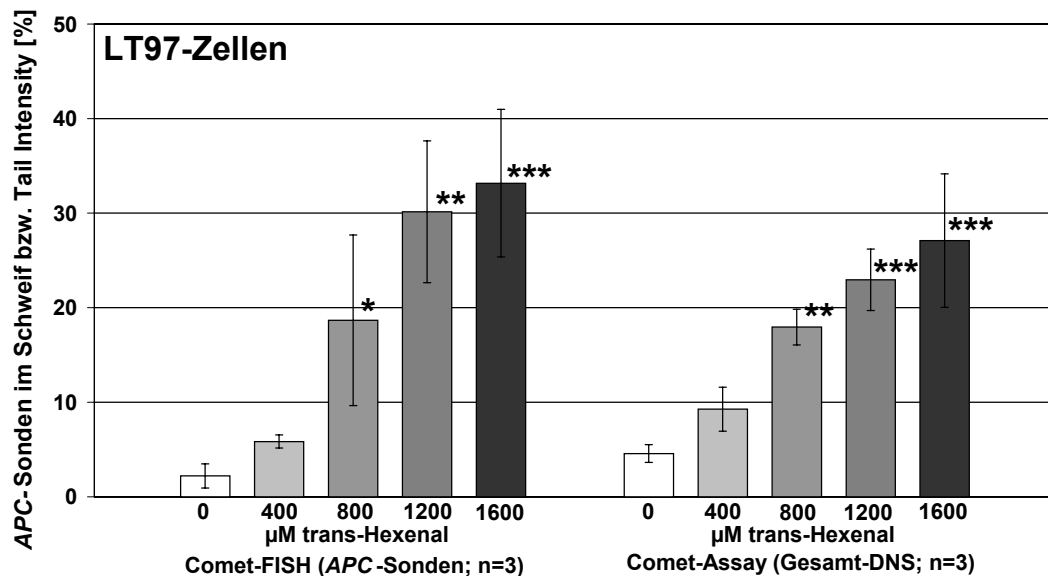


Abbildung 52: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *APC*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In den HNE-geschädigten LT97-Zellen war zu erkennen, dass das *APC* ab einer Konzentration von 200 μ M signifikant in den Kometenschweif auswanderte. So lagen nach Schädigung mit

200 μM HNE $20,9 \pm 5,7$ % der Signale im Schweif und nach Schädigung mit 250 μM HNE $29,6 \pm 12,6$ %. Diese genspezifischen Schäden in den HNE-behandelten LT97-Zellen unterschieden sich nicht von den HNE-induzierten Schäden an der Gesamt-DNS (Abbildung 53).

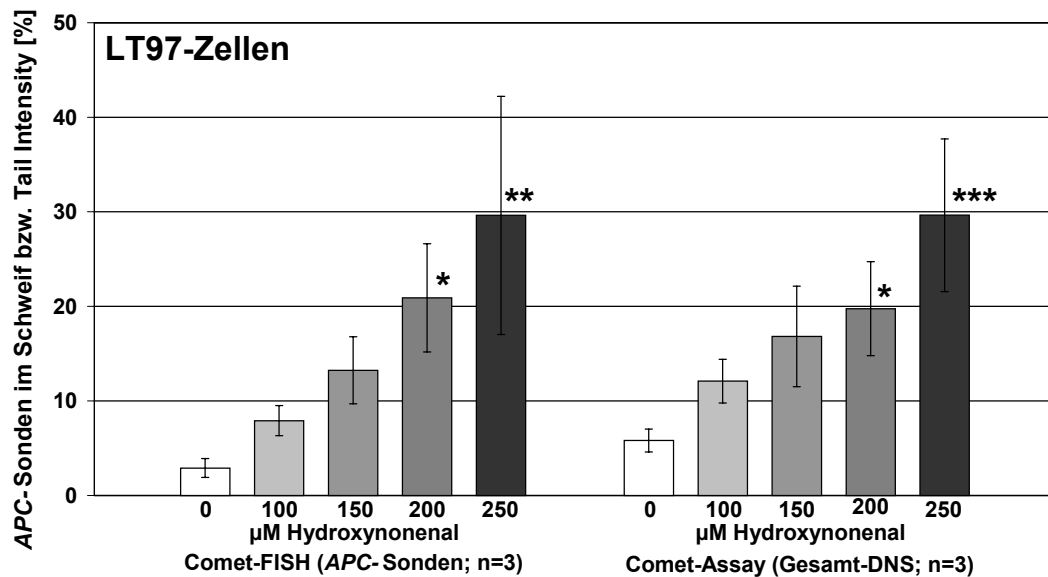


Abbildung 53: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der APC-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die mit *KRAS*-Sonden hybridisierten, H_2O_2 -behandelten LT97-Zellen wiesen ab einer Konzentration von 37,5 μM signifikante Schäden im *KRAS*-Genbereich auf ($12,6 \pm 3,0$ %). Diese genspezifischen Schäden stiegen dosisabhängig weiter an und nach 75 μM bzw. 150 μM H_2O_2 lagen $19,3 \pm 1,8$ % bzw. $25,3 \pm 7,6$ % der Signale im Kometenschweif. Im Vergleich zu den H_2O_2 -induzierten Schäden an der Gesamt-DNS ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die *KRAS*-Sonden wanderten in gleichem Maße wie die gesamte DNS in den Kometenschweif (Abbildung 54; $n = 3$).

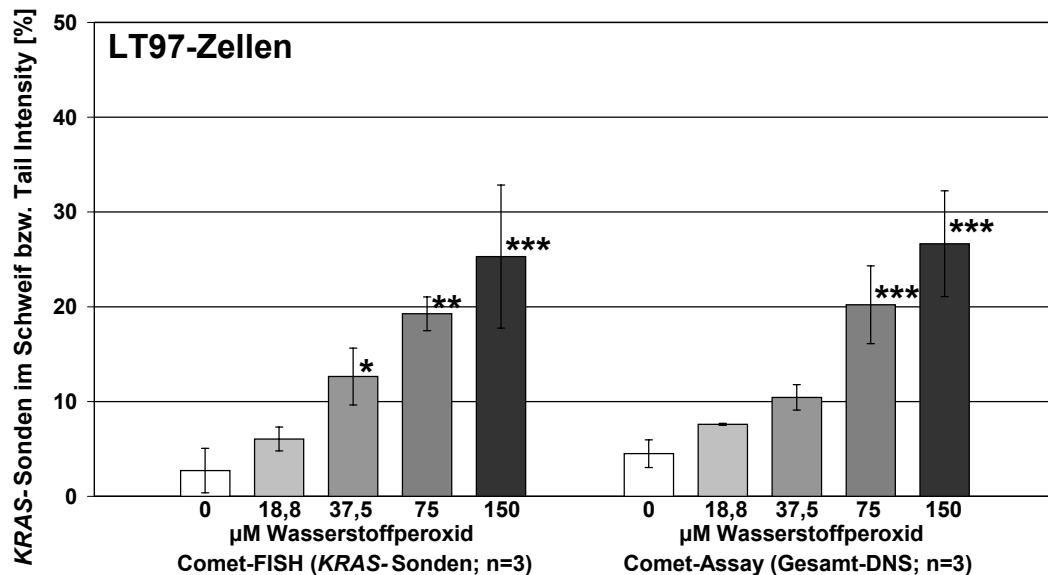


Abbildung 54: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Auch in Hexenal-geschädigten LT97-Zellen wurden drei Comet-FISH-Versuche unter Verwendung von *KRAS*-Sonden durchgeführt. Ab einer Hexenalkonzentration von 800 µM wanderte *KRAS* signifikant in den Kometenschweif aus ($14,8 \pm 5,0$ %). Mit zunehmender Hexenalkonzentration stieg der prozentuale Anteil der *KRAS*-Sonden im Schweif weiter an und lag nach Schädigung mit 1600 µM Hexenal bei $28,9 \pm 4,5$ %. Die Auswanderung der *KRAS*-Sonden entsprach damit etwa der der als TI-Werte gemessenen Gesamt-DNS, so dass sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ergaben (Abbildung 55).

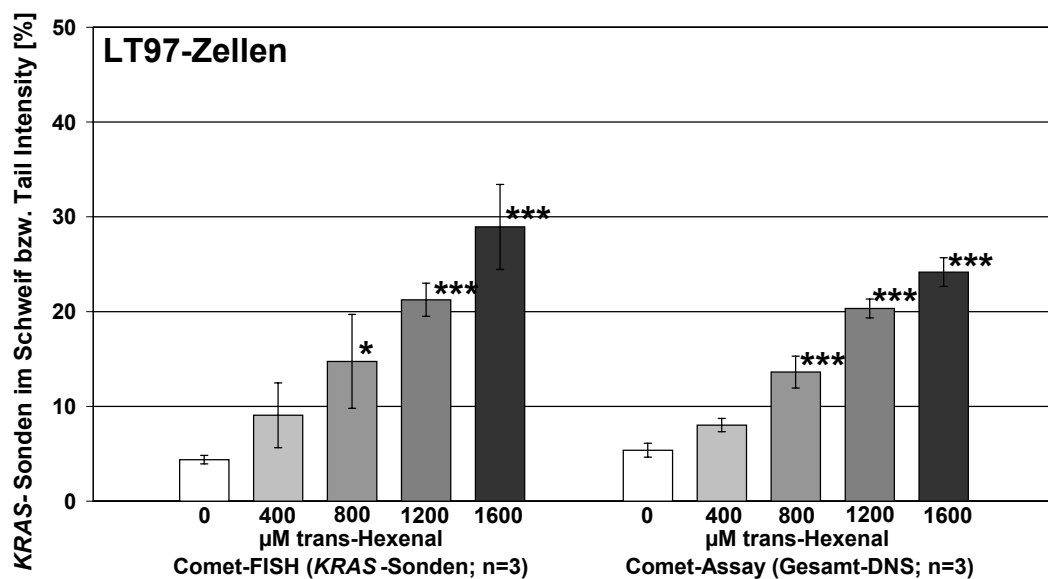


Abbildung 55: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Ergebnisse zum *KRAS*-spezifischen Einfluss von HNE auf LT97-Zellen sind in Abbildung 56 zusammengefasst (n = 3). Es ergab sich ein guter Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhang, wobei die *KRAS*-Signale ab einer Konzentration von 150 µM HNE signifikant in den Kometenschweif auswanderten. Nach Schädigung mit 250 µM HNE lagen schließlich $28,3 \pm 2,4$ % der Signale im Kometenschweif. Der Vergleich mit den Comet-Assay-Ergebnissen ließ keine verstärkte Auswanderung der *KRAS*-Signale gegenüber der Gesamt-DNS erkennen.

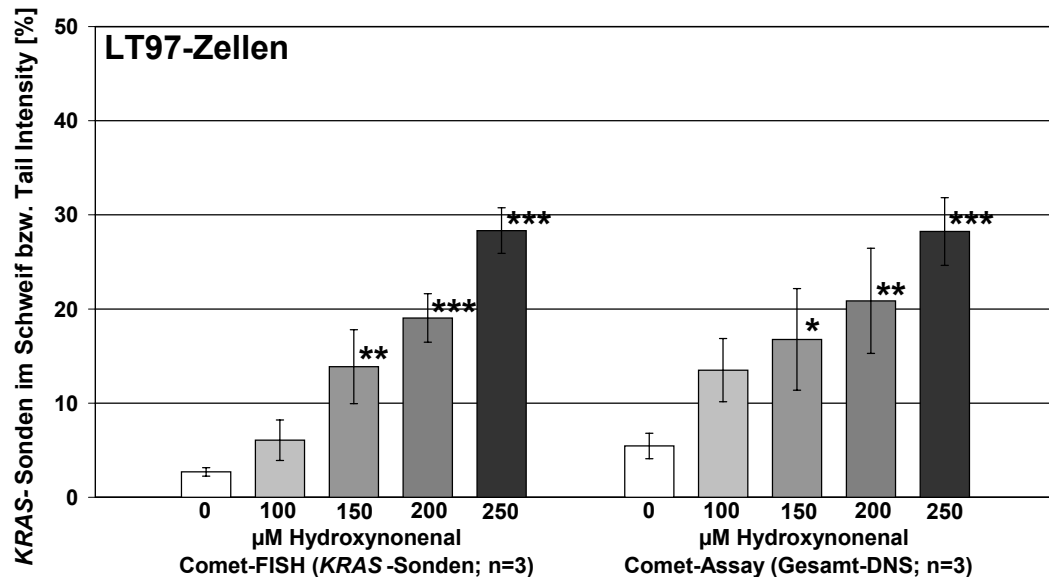


Abbildung 56: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die Ergebnisse der Comet-FISH-Versuche in LT97-Zellen unter Verwendung von *TP53*-Sonden sind in Abbildung 57 bis 59 dargestellt. In den H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen waren die *TP53*-spezifischen Schäden nach Inkubation mit 75 µM H₂O₂ statistisch signifikant. Von den Fluoreszenzsignalen waren $18,1 \pm 2,8$ % in den Kometenschweif ausgewandert, wobei dieser Anteil mit höherer H₂O₂-Konzentration weiter anstieg und nach 150 µM H₂O₂ bei $24,6 \pm 10,8$ % lag. Gegenüber der im Comet-Assay gemessenen Schädigung der Gesamt-DNS ließ sich kein Unterschied feststellen. Die *TP53*-Sonden wanderten in gleichem Maße aus den Zellen aus, wie die gesamte DNS (Abbildung 57; n = 3).

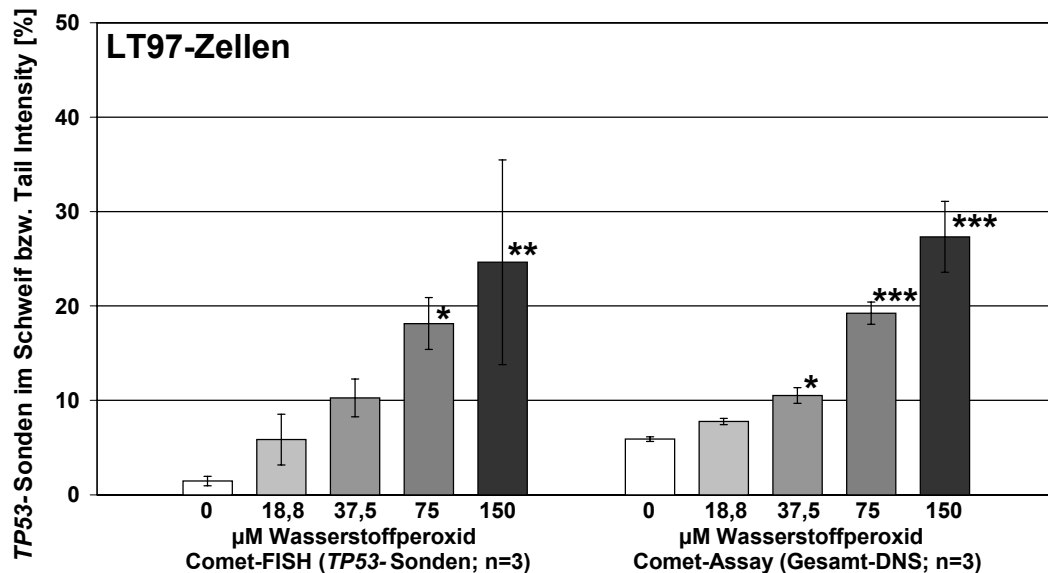


Abbildung 57: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In den Hexenal-geschädigten LT97-Zellen fanden sich die TP53-Sonden bereits ab 400 µM Hexenal vermehrt im Kometenschweif ($12,9 \pm 4,0$ %). Der Anteil der aus den Zellen ausgewanderten Sonden stieg mit höherer Hexenalkonzentration weiter an und lag schließlich bei $36,4 \pm 5,7$ % (1600 µM). Für die beiden höchsten Konzentrationen waren die TP53-spezifischen Schäden gegenüber denen an der Gesamt-DNS signifikant erhöht (Abbildung 58; $n = 4$).

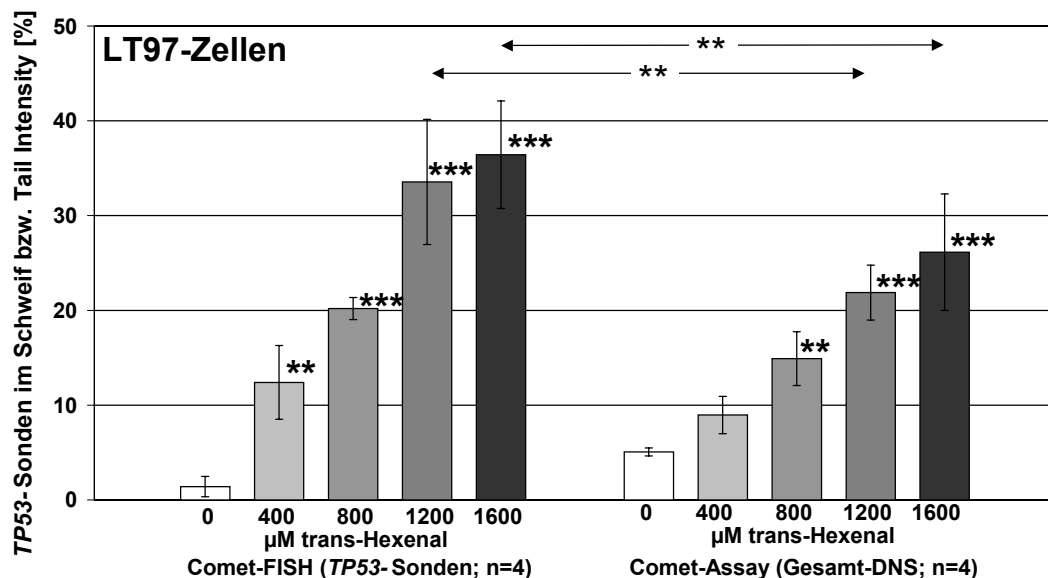


Abbildung 58: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der TP53-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: ** $p < 0,01$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Nach HNE-Behandlung wiesen die LT97-Zellen ab einer Konzentration von 150 μM HNE hoch signifikante *TP53*-spezifische Schäden auf, wobei $31,6 \pm 9,0 \%$ der *TP53*-Sonden im Kometenschweif lagen. Dieser Wert stieg nach Schädigung mit 200 μM bzw. 250 μM HNE weiter an ($42,9 \pm 5,7 \%$ bzw. bei $50,4 \pm 7,4 \%$). Die Unterschiede zwischen den aus den Zellen ausgewanderten DNS-Sonden und der Gesamt-DNS waren für 200 μM und 250 μM HNE signifikant (Abbildung 59; $n = 3$).

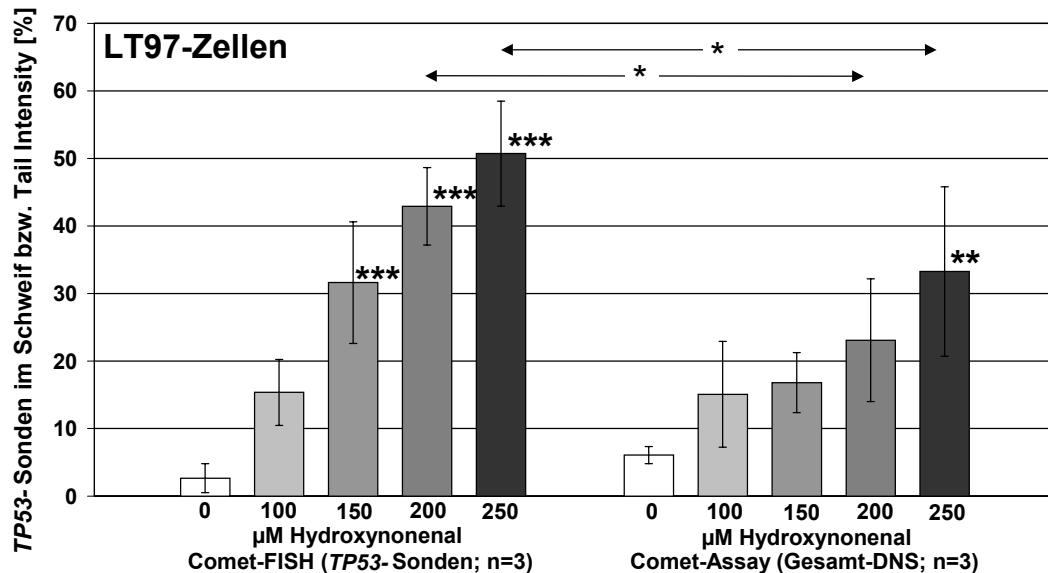


Abbildung 59: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Vergleich der *TP53*-spezifischen Schäden mit den Schäden an der gesamten DNS.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS: * $p < 0,05$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.3.5.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Comet-FISH-Untersuchungen (Abschnitt 4.3.5.1 und 4.3.5.2) sind in Tabelle 9 zusammengefasst, wobei die Unterschiede zwischen genspezifischen und generellen DNS-Schäden durch Angabe des jeweils höchsten Signifikanzniveaus der statistischen Auswertung kenntlich gemacht wurden. In dieser tabellarischen Übersicht wird deutlich, dass die Lipidperoxidationsprodukte Hexenal und HNE wesentlich häufiger genspezifische Schäden in den untersuchten Genen induzierten als H_2O_2 . Zudem lässt sich erkennen, dass die primären Kolonzellen tendenziell sensibler reagierten als die LT97-Kolonadenomzellen. So wurde in den Primärzellen bei sieben der neun Versuchsserien eine signifikant erhöhte Auswanderung der Gensonden in den Kometenschweif gefunden. Bei den LT97-Zellen konnte dieser Effekt nur in zwei der neun Versuchsserien beobachtet werden. Ebenso ließ sich eine tendenziell höhere Sensitivität des *TP53*-Gens gegenüber den eingesetzten Modellsubstanzen erkennen. Auf den Vergleich der im Rahmen der Comet-FISH-Untersuchungen verwendeten Gene und Zellen soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Tabelle 9: Übersicht über die genspezifischen Schäden im *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen.

Gensonde	Primäre Kolonzellen		LT97-Kolonadenomzellen	
	Testsubstanz	genspezifische Schäden > generelle DNS-Schäden	Testsubstanz	genspezifische Schäden > generelle DNS-Schäden
<i>APC</i>	H ₂ O ₂		H ₂ O ₂	
	Hexenal	*	Hexenal	
	HNE	***	HNE	
<i>KRAS</i>	H ₂ O ₂		H ₂ O ₂	
	Hexenal	***	Hexenal	
	HNE	**	HNE	
<i>TP53</i>	H ₂ O ₂	***	H ₂ O ₂	
	Hexenal	***	Hexenal	**
	HNE	***	HNE	*

Zusammengefasst ist der Vergleich der genspezifischen Schäden mit den Schäden in der Gesamt-DNS unter Angabe des jeweils höchsten Signifikanzniveaus. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.3.6 Vergleich der untersuchten Gene

Die genspezifischen Schäden im *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen konnten direkt miteinander verglichen werden, da sich die durch eine bestimmte Testsubstanz induzierten und parallel zu den jeweiligen Comet-FISH-Versuchen quantifizierten Schäden in der Gesamt-DNS nicht unterschieden. Für den Genvergleich wurden dabei die in den H₂O₂-, Hexenal- bzw. HNE-geschädigten Zellen erhaltenen Ergebnisse mittels Two-way-ANOVA ausgewertet. Die Standardabweichungen und die statistischen Angaben zur Dosisabhängigkeit der genspezifischen Schäden sind in den Abschnitten 4.3.5.1. und 4.3.5.2 gegeben. Der Vergleich der Comet-FISH-Ergebnisse mit *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden ist für H₂O₂-geschädigte Primärzellen und LT97-Zellen in Abbildung 60 dargestellt ($n = 3$). In den primären Kolonzellen unterschieden sich die für das *APC*- und *KRAS*-Gen erhaltenen Ergebnisse nicht voneinander. Die Sonden beider Gene wanderten im gleichen Ausmaß in den Kometenschweif geschädigter Zellen aus. Verglichen mit dem *APC*- und *KRAS*-Gen wanderten die *TP53*-Sonden vermehrt in den Schweif aus, ein Effekt, der nach Schädigung mit 150 μ M H₂O₂ signifikant war.

Im Gegensatz zu den Primärzellen war es in den H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen die *APC*-Sonde, die die stärksten genspezifischen Schäden aufwies, während *KRAS* und *TP53* in gleichem Maße geschädigt waren. Dabei war der Unterschied zwischen *APC*- und *TP53*-Gen für die beiden höchsten Konzentrationen und der Unterschied zum *APC*- und *KRAS*-Gen für die höchste Konzentration statistisch signifikant.

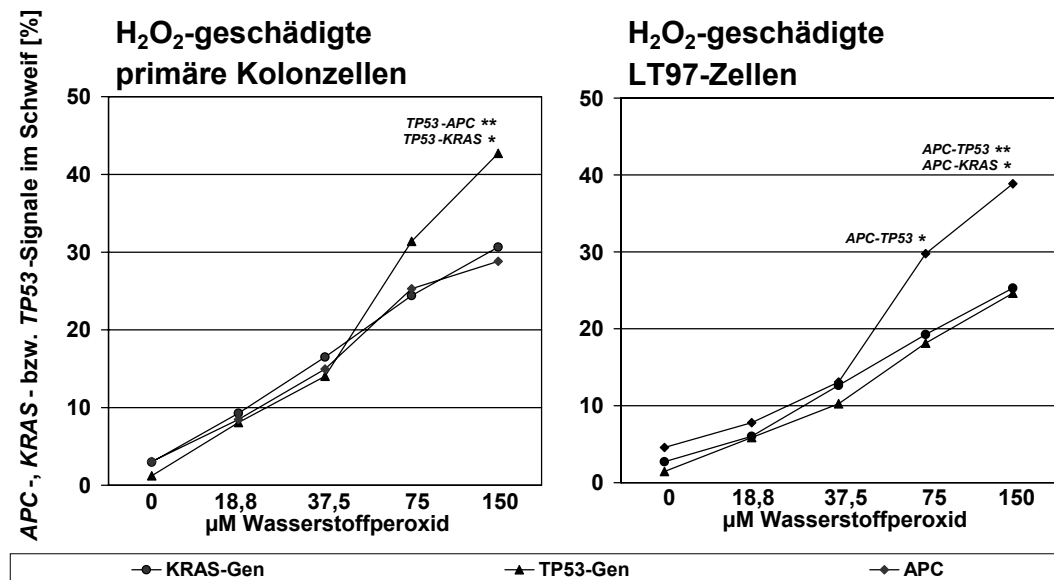


Abbildung 60: H₂O₂-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.

Angaben als MW \pm SD. Vergleich der Gene: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Die vergleichende Zusammenstellung der genspezifischen Schäden in Hexenal-behandelten Primär- und LT97-Zellen ist in Abbildung 61 gegeben ($n = 3-4$). Nach Behandlung der Zellen mit Hexenal wurden keine Unterschiede in der genspezifischen Auswanderung des APC- und KRAS-Gens gefunden. Die Sonden beider Gene lagen sowohl in den Primärzellen als auch in den LT97-Zellen mit gleicher Häufigkeit im Kometenschweif. In den Primärzellen wanderten die TP53-Sonden gegenüber dem APC und KRAS vermehrt in den Kometenschweif aus, wobei dieser Unterschied für die zweithöchste Hexenalkonzentration signifikant war. Auch in den LT97-Zellen lagen die TP53-spezifischen Schäden über denen des APC- und KRAS-Gens. Hier war der Unterschied zwischen TP53 und KRAS nach Schädigung der Zellen mit 1200 μ M Hexenal statistisch signifikant, während der Unterschied zwischen TP53 und APC zwar zu erkennen war, aber nicht statistisch gesichert werden konnte.

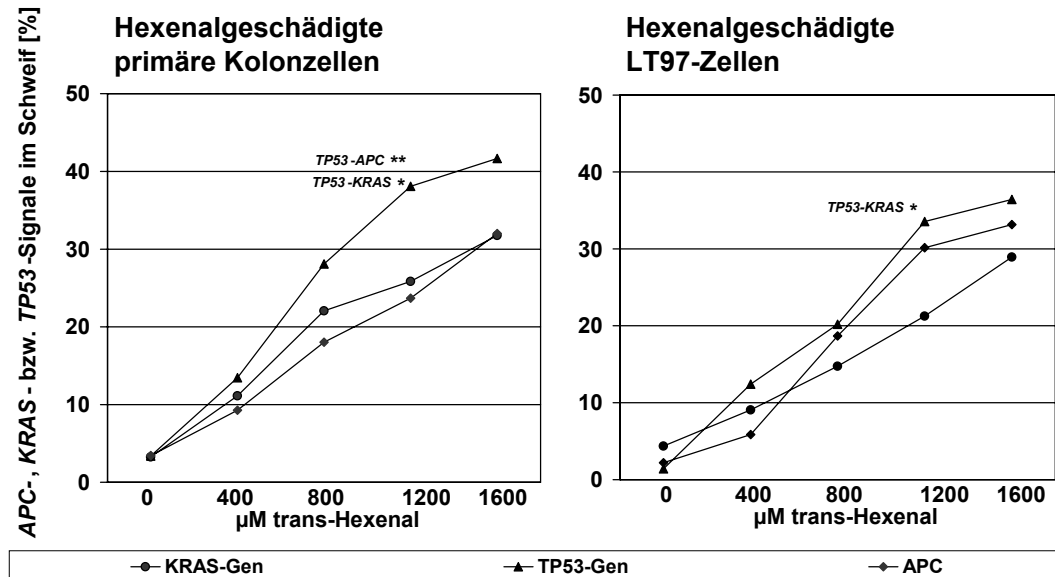


Abbildung 61: Hexenal-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.

Angaben als MW \pm SD. Vergleich der Gene: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

In Abbildung 62 ist die vergleichende Gegenüberstellung der APC-, KRAS- und TP53-spezifischen Schäden in HNE-geschädigten Primär- bzw. LT97-Zellen dargestellt ($n = 3-4$). Auch hier wanderten die APC- und KRAS-Signale in beiden Zelltypen mit gleicher Häufigkeit in den Kometenschweif aus. Die TP53-Signale wanderten vermehrt in den Kometenschweif aus, wobei dieser Effekt in den primären Kolonzellen für die höchste HNE-Konzentration gegenüber dem KRAS-Gen statistisch signifikant war. In den LT97-Zellen hingegen war die höhere Sensitivität des TP53-Gens sowohl im Vergleich zum APC als auch im Vergleich zum KRAS für die drei höchsten HNE-Konzentrationen statistisch signifikant.

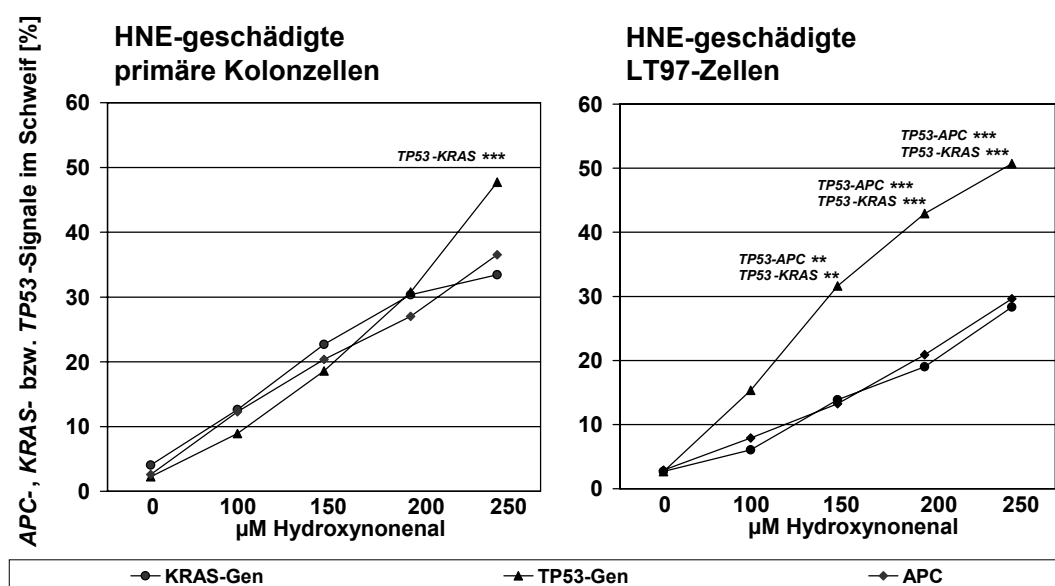


Abbildung 62: HNE-geschädigte Primär- bzw. LT97-Zellen: Vergleich der APC-, KRAS- bzw. TP53-spezifischen Schäden.

Angaben als MW \pm SD ($n = 3-4$). Vergleich der Gene: *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Eine zusammenfassende Übersicht über die spezifische Sensitivität des *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-Gens ist in Tabelle 10 gegeben, wobei für die einzelnen Gene angegeben ist, ob sie vergleichbare (x) oder signifikant unterschiedliche (*) genspezifische Schäden aufwiesen. Für die statistisch signifikanten Unterschiede ist das höchste Signifikanzniveau angegeben.

Tabelle 10: Übersicht über die spezifische Sensitivität des *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-Gens.

Zellen	Modell-substanz	Sensitivität des <i>APC</i> -, <i>KRAS</i> - und <i>TP53</i> -Gens					
		<i>APC</i> > <i>KRAS</i>	<i>APC</i> = <i>KRAS</i>	<i>TP53</i> < <i>APC</i>	<i>TP53</i> > <i>APC</i>	<i>TP53</i> = <i>KRAS</i>	<i>TP53</i> > <i>KRAS</i>
Primäre Kolonzellen	H ₂ O ₂		x		**		*
	Hexenal		x		**		*
	HNE		x		(Tendenz)		***
LT97-Kolonadenomzellen	H ₂ O ₂	**		**		x	
	Hexenal		x		(Tendenz)		*
	HNE		x		**		***

Zusammengefasst ist der Vergleich der genspezifischen Sensitivitäten unter Angabe des jeweils höchsten Signifikanzniveaus. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Der in Tabelle 10 dargestellte Genvergleich ergibt für fünf der sechs Versuchsserien einen einheitlichen Trend. Sowohl in H₂O₂-, Hexenal- bzw. HNE-geschädigten Primärzellen als auch in Hexenal- bzw. HNE-geschädigten LT97-Zellen wiesen *APC* und *KRAS* eine gleiche spezifische Sensitivität auf. Zudem ließ sich für diese Versuche eine erhöhte Empfindlichkeit des *TP53*-Gens gegenüber *KRAS* feststellen. Eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit des *TP53*-Gens fand sich für drei der Versuchsserien auch gegenüber *APC*, während dieser Effekt für HNE-geschädigte Primärzellen und Hexenal-geschädigte LT97-Zellen zwar als Tendenz vorhanden war, aber nicht statistisch gesichert werden konnte. Der Genvergleich in den H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen wich von diesem Schema ab, da in dieser Versuchserie das *APC*-Gen signifikant empfindlicher als *KRAS* und *TP53* reagierte.

4.3.7 Vergleich der verwendeten Zellen

Um die genspezifischen Schäden in Primärzellen und LT97-Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten vor der statistischen Auswertung normalisiert. Dazu wurden die Comet-FISH-Ergebnisse (Anteil der Sonden im Kometenschweif [%]) durch die normalisierten TI-Werte der dazugehörigen Comet-Assay-Versuche dividiert. Durch diesen Rechenschritt wurde die unterschiedliche Sensitivität der Gesamt-DNS in Primär- bzw. LT97-Zellen gegenüber den verwendeten Testsubstanzen berücksichtigt. Die Auswertung der normalisierten Daten mittels Two-way-ANOVA ergab für vier Datensätze einen Unterschied zwischen Primärzellen und LT97-Zellen (Abbildung 63 bis 66). In den Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass die Primärzellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber genspezifischen Schäden aufwiesen. Für *APC*-spezifische Schäden zeigte sich dieser Unterschied zwischen primären Kolonzellen und LT97-Kolonadenomzellen nach HNE-Inkubation. Die höhere Sensitivität der Primärzellen war für die höchste HNE-Konzentration (250 μ M) statistisch signifikant (Abbildung 63; $n = 3$).

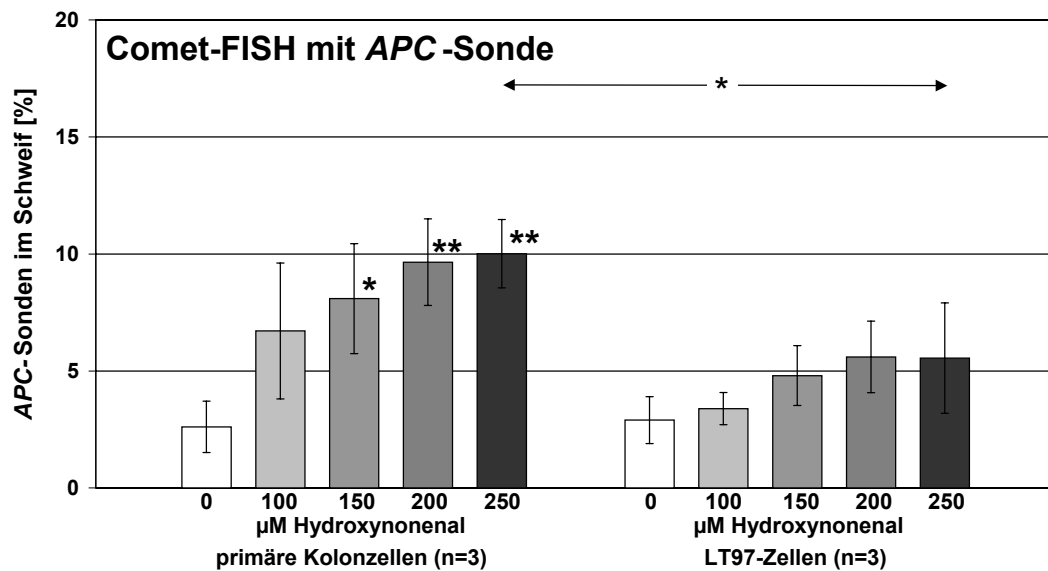


Abbildung 63: Vergleich der APC-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach HNE-Inkubation.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: * $p < 0,05$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Bei Verwendung von *KRAS*-Sonden waren es sowohl die H_2O_2 - als auch die HNE-behandelten Zellen, bei denen die Unterschiede zwischen Primär- und LT97-Zellen signifikant waren. In den H_2O_2 -geschädigten Zellen war die erhöhte Sensitivität der Primärzellen für die beiden höchsten Konzentrationen statistisch signifikant, während sich in den HNE-behandelten Zellen sogar für alle vier HNE-Konzentrationen eine signifikant erhöhte Sensitivität der Primärzellen zeigte (Abbildung 64 und 65; $n = 3$).

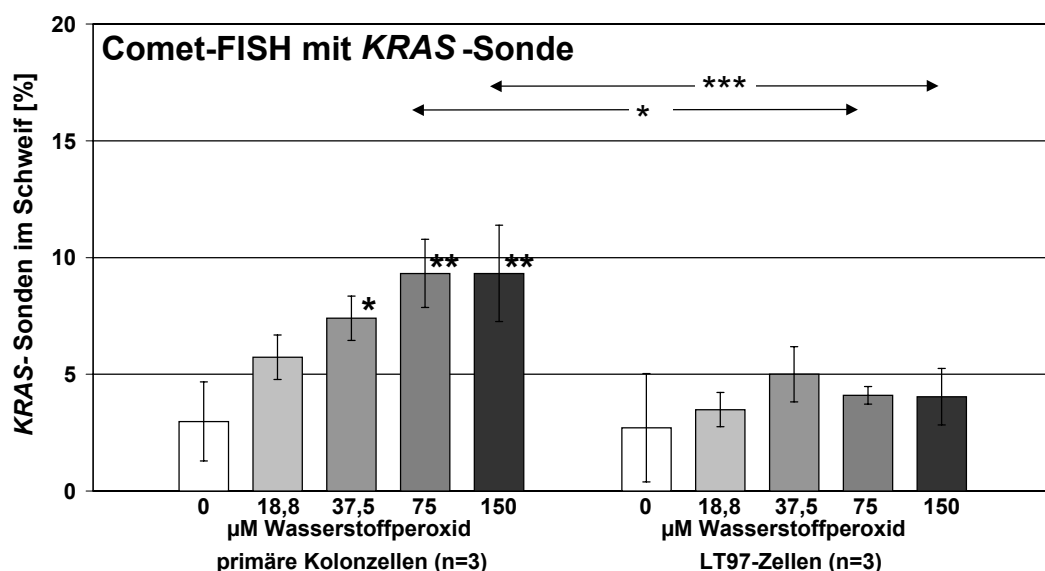


Abbildung 64: Vergleich der KRAS-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach H_2O_2 -Inkubation.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

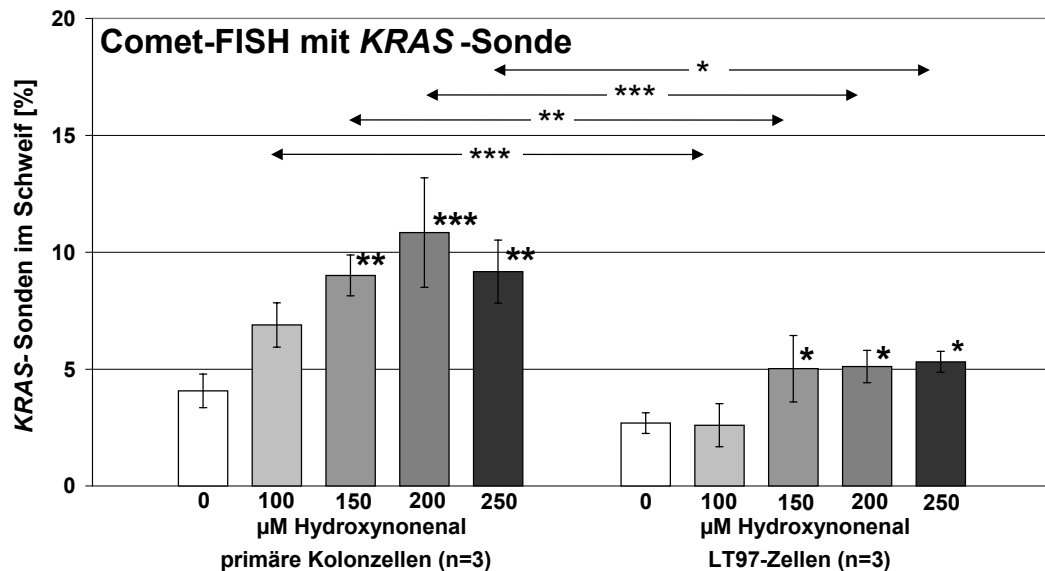


Abbildung 65: Vergleich der *KRAS*-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach HNE-Inkubation.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Für das *TP53*-Gen fand sich die erhöhte genspezifische Empfindlichkeit der primären Kolonzellen nach Schädigung mit H_2O_2 (Abbildung 66; $n = 3$). Hier war der Effekt nach Behandlung der Zellen mit 75 μM und 150 μM H_2O_2 statistisch hoch signifikant.

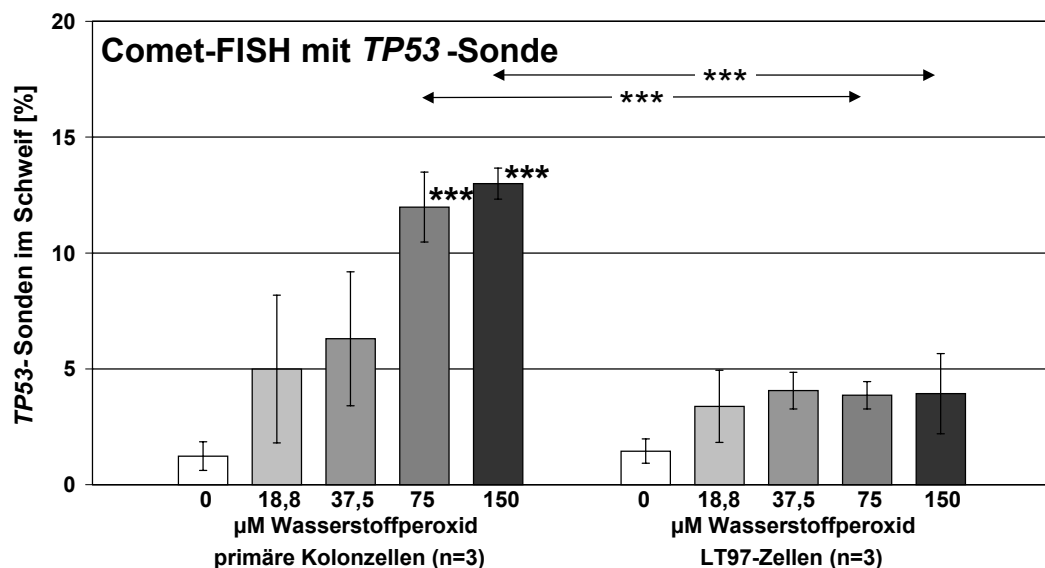


Abbildung 66: Vergleich der *TP53*-spezifischen Sensitivität der primären Kolonzellen und LT97-Zellen nach H_2O_2 -Inkubation.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest); Vergleich der Zellen: *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

Eine zusammenfassende Übersicht über die genspezifische Sensitivität von primären Kolonzellen und LT97-Kolonadenomzellen ist in Tabelle 11 gegeben. In dieser ist angegeben, ob die primären Kolonzellen sensitiver als die LT97-Kolonadenomzellen reagierten (*) oder beide Zellsysteme gleich empfindlich gegenüber genspezifischen Schäden waren (x). Für die

statistisch signifikanten Unterschiede wurde wiederum das höchste Signifikanzniveau angegeben.

Tabelle 11: Übersicht über die genspezifische Sensitivität von LT97- und primären Kolonzellen.

Gensonde	Testsubstanz	Sensitivität der Zellen	
		Primärzellen = LT97-Zellen	Primärzellen > LT97-Zellen
<i>APC</i>	H ₂ O ₂	x	
	Hexenal	x	
	HNE		*
<i>KRAS</i>	H ₂ O ₂		***
	Hexenal	x	
	HNE		***
<i>TP53</i>	H ₂ O ₂		***
	Hexenal	x	
	HNE	x	

Zusammengefasst ist der Vergleich der genspezifischen Sensitivitäten der untersuchten Zellen unter Angabe des jeweils höchsten Signifikanzniveaus. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (signifikant in Two-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

4.3.8 Gebrochene Signale in den Comet-FISH-Versuchen

Im Rahmen der Comet-FISH-Auswertung wurde für die einzelnen OT auch die Anzahl der gebrochenen Signale in den ausgewerteten Zellen erfasst. Bei einem Bruch im untersuchten Genbereich lagen die Signalfragmente stets in Elektrophoreserichtung hintereinander angeordnet, was auf einen direkten Bruch der jeweiligen Genregion schließen ließ (Abbildung 67). Durchschnittlich wiesen $2,6 \pm 1,6$ Zellen je OT ein gebrochenes Signal auf, wobei dieser Wert für das *APC*-Gen bei $2,6 \pm 1,4$ Zellen/OT, für das *KRAS*-Gen bei $3,0 \pm 1,7$ Zellen/OT und für das *TP53*-Gen bei $2,1 \pm 1,6$ Zellen/OT lag. Auf die Anzahl der ausgewerteten Zellen bezogen bedeutet dies, dass durchschnittlich 1,9 % (*APC*), 2,4 % (*KRAS*) bzw. 2,2 % (*TP53*) der Zellen gebrochene Signale aufwiesen. Die gebrochenen Signale traten unabhängig von den jeweiligen Schädigungskategorien auf. Ebenso fanden sich keine Unterschiede zwischen den Testsubstanzen, den verwendeten Gensonden oder Zellen.

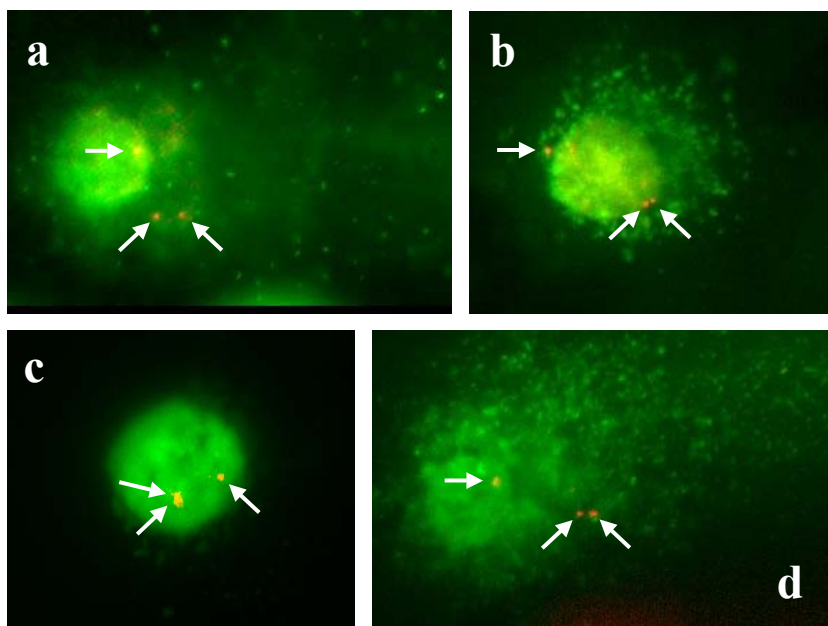


Abbildung 67: Gebrochene Hybridisierungssignale in einer a) HNE-geschädigten LT97-Zelle (*TP53*), b) H₂O₂-geschädigten LT97-Zelle (*APC*), c) HNE-geschädigten primären Kolonzelle (*KRAS*) bzw. d) Hexenal-geschädigten primären Kolonzelle (*TP53*).

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera. In den Abbildungen sind die Hybridisierungssignale jeweils durch Pfeile kenntlich gemacht.

4.3.9 Zwei-Farben- und Drei-Farben-FISH-Versuche

Die Zwei-Farben-FISH-Versuche wurden mit direktmarkierten DNS-Proben für das *TP53*-Gen in Kombination mit *APC* bzw. *KRAS* durchgeführt. Für das *TP53* wurden TexasRed-markierte Sonden verwendet, während *APC* und *KRAS* mit FITC grün markiert waren. Die Hybridisierung wurde stets in unbehandelten primären Kolonzellen ($n = 3$) bzw. in unbehandelten LT97-Zellen ($n = 3$) durchgeführt. Wenn man von der Hybridisierungsgüte der Comet-FISH-Versuche mit einzelnen Gensonden ausgeht (siehe Abschnitt 4.3.3) hätten rein rechnerisch 66-68 % der Zellen mit den Sonden beider Gene hybridisiert sein sollen. Praktisch waren es immer nur wenige Zellen, die gut auswertbare Signale von *TP53*- und *APC*-Gen bzw. vom *TP53*- und *KRAS*-Gen zeigten. Beispielhaft sind in den Abbildung 68 unbehandelte primäre Kolonzellen abgebildet, die im Rahmen der Zwei-Farben-FISH-Versuche erhalten wurden. Von einer quantitativen Auswertung der Zwei-Farben-FISH-Versuche wurde aufgrund der schlechten Hybridisierungseffizienz abgesehen.

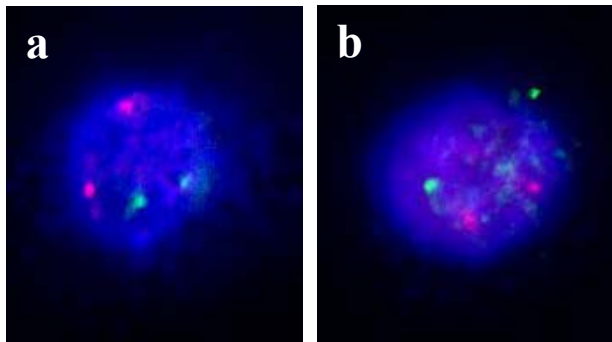


Abbildung 69: Aufnahme einer a) unbehandelten primären Kolonzelle bzw. b) LT97-Zelle, die mit *TP53*- (rote Signale), *APC*- (grüne Signale) und *KRAS*-Sonden (rot-grüne Signale) hybridisiert wurde (Drei-Farben-FISH).

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera.

Bei den Drei-Farben-FISH-Versuchen wurden direktmarkierte Sonden verwendet und alle drei Gensonden miteinander kombiniert. Wie beim Zwei-Farben-FISH wurden auch hier unbehandelte primäre Kolonzellen ($n = 3$) bzw. unbehandelte LT97-Zellen ($n = 3$) für die Versuche verwendet. Für die Drei-Farben-FISH-Versuche ergab sich eine theoretische Hybridisierungseffizienz von 44,5 %. Allerdings wiesen in den verschiedenen Versuchen immer nur einzelne Zellen alle sechs Hybridisierungssignale auf. Auf eine quantitative Auswertung der Drei-Farben-FISH-Versuche wurde daher verzichtet. Beispielhaft sind in Abbildung 69 eine mit allen drei Genen hybridisierte primäre Kolonzelle und eine entsprechend hybridisierte LT97-Kolonadenomzelle dargestellt.

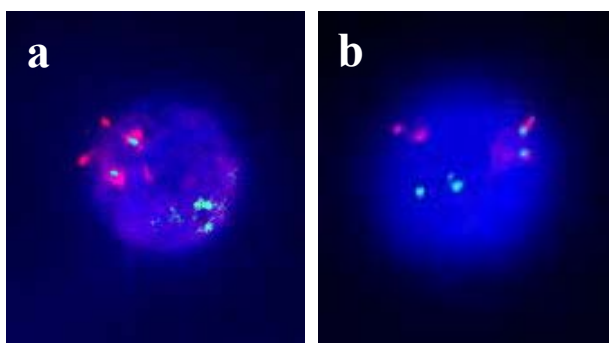


Abbildung 68: Aufnahmen unbehandelter primärer Kolonzellen, die mit a) *TP53*- (rote Signale) und *APC*-Sonden (grüne Signale) bzw. b) *TP53*- (rote Signale) und *KRAS*-Sonden (grüne Signale) hybridisiert wurden (Zwei-Farben-FISH).

Aufnahme der Zellen in 400-facher Vergrößerung an einem ZEISS Axiovert M100 unter Verwendung einer schwarz-weiß MicroMAX Digital CCD Kamera.

4.3.10 Comet-FISH-Versuche mit Ganzchromosomenproben

Die Versuche mit Ganzchromosomenproben und genspezifischen Sonden wurden mit direktmarkierten Hybridisierungsproben für Chromosom 17 und *TP53* durchgeführt, wobei das Chromosom 17 FITC- und die *TP53*-Sonde TexasRed-markiert war. Als Zellen wurden unbehandelte primäre Kolonzellen ($n = 3$) und LT97-Zellen ($n = 3$) verwendet sowie H_2O_2 -geschädigte primäre Kolonzellen ($n = 1$) und LT97-Zellen ($n = 1$). In den hybridisierten Zellen erschien Chromosom 17 als diffuses grünes Signal, innerhalb dessen die beiden klar umrissenen Signale des *TP53* lagen. Während die Gesamt-DNS-Schäden und die Lage der *TP53*-Signale quantifiziert werden konnte, ließ sich das diffuse Signal des Chromosom 17 nicht quantitativ erfassen. Von weiteren Versuchen wurde abgesehen.

5 DISKUSSION

Kolonzellen sind unverzichtbar für die Erforschung der molekularen Mechanismen der humanen Kolonkarzinogenese. Dabei spiegeln aus unauffälligem Gewebe isolierte Primärzellen den normalen Zustand des gesunden Kolons wider und aus Kolonadenomen oder -karzinomen gewonnene Zelllinien das Tumorstadium aus dem sie etabliert wurden. Dem jeweiligen Stadium der kolorektalen Karzinogenese entsprechend weisen die Zellen einen spezifischen Karyotyp und Metabolismus auf, der die zellulären Eigenschaften und Sensitivitäten bestimmt. Durch Verwendung dieser unterschiedlichen Zellmodelle lassen sich die aufeinanderfolgenden Phasen der Tumorentstehung untersuchen und charakterisieren, wobei vor allem die zelltypischen Sensitivitäten hinsichtlich genereller und genspezifischer DNS-Schädigung interessieren. Der Nachweis, dass endogene, aufgrund einer bestimmten Ernährung gebildete Noxen in den für die humane Kolonkarzinogenese relevanten Genen spezifische Schäden setzen, sollte schließlich zu einem besseren Verständnis der molekulargenetischen Prozesse führen und ein weiteres Puzzleteil zum Gesamtbild der ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese hinzufügen.

5.1 Zell- und Kryptisolierung aus Gewebeproben

Im ersten Teil der Diskussion werden die im Rahmen der Kolongewebeaufarbeitung gewonnenen Ergebnisse vor dem Hintergrund aktueller Publikationen erörtert. In der Literatur ist vor allem die Verwendung von humanem Kolongewebe [Pedersen et al., 2000a; Mills et al., 2001; Schaeferhenrich et al., 2003a; Seidelin et al., 2003] und Rattenkolongewebe [Dzierzewicz et al., 2000; Robert et al., 2001] beschrieben, während Arbeiten mit dem Gewebematerial anderer Tierarten, wie Maus [Booth et al., 1995], Kaninchen [Benya et al., 1991] oder Schwein [Leschelle et al., 2002] eher eine Ausnahme darstellen. Wie in der vorliegenden Arbeit ist das Ziel der Gewebeaufarbeitung die Gewinnung von Krypten [Brooks et Winton, 1996; Winton und Brooks, 1998; Liegibel et al., 2000; Seidelin et al., 2003] bzw. Primärzellen [Benya et al., 1991; Pedersen et al., 2000a; Pedersen et al., 2000b; Schaeferhenrich et al., 2003a] und deren Verwendung in unterschiedlichen Versuchssystemen. Darüber hinaus wird immer wieder versucht aus den isolierten Kolonzellen Kurzzeit-Zellkulturen zu etablieren [Booth et al., 1995; Pedersen et al., 2000a; Pedersen et al., 2000b; Dzierzewicz et al., 2000; Seidelin et al., 2003].

Zur **Isolierung der Krypten und Primärzellen** werden in der Literatur unterschiedliche Techniken beschrieben, wobei auf die mechanische Gewebeaufarbeitung stets die Vereinzelung der Krypten und Zellen folgt. Diese beruht zumeist auf einer chemischen Auflösung des Zellverbundes und/ oder einem enzymatischen Gewebeverdau. So ist in der Literatur die Verwendung von Chelatbildnern wie EDTA [Leschelle et al., 2002] bzw. EDTA/EGTA [Pedersen et al., 2000b; Seidelin et al., 2003] beschrieben und auch der Verdau des Kolonepithels unter Verwendung von Collagenase [Benya et al., 1991; Dzierzewicz et al., 2000],

Collagenase/Dispase [Gibson et al., 1989; Benya et al., 1991; Booth et al., 1995], Collagenase/Pronase [Benya et al., 1991], Pronase/DNAse [Benya et al., 1991] bzw. Collagenase/Proteinase [Pool-Zobel und Leucht, 1997; Liegibel et al., 2000; Schaeferhenrich et al., 2003a].

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Gewebeaufarbeitung wurde die mechanische Aufarbeitung mit sich anschließendem Collagenase/Proteinase-Verdau gewählt. Diese Methode ermöglichte bei einer auf 120 Minuten verlängerten Verdauzeit die Isolierung von durchschnittlich $45,6 \times 10^6$ Zellen/g Mukosa. Zur Beurteilung dieses Wertes kann auf die Arbeiten von Benya et al. [1991] verwiesen werden, die verschiedene Möglichkeiten der chemisch-enzymatischen Gewebeaufarbeitung miteinander verglichen. Die Autoren arbeiteten Kolonepithel von Kaninchen auf und fanden die höchsten Zellzahlen nach 90 minütigem Pronase/Collagenase-Verdau, wobei sie $34,5 \pm 3,0 \times 10^6$ Zellen/g Mukosa erhielten. Die in der vorliegenden Arbeit durchschnittlich gewonnenen Zellmengen liegen über diesem Zahlenwert und sprechen für das verwendete System und die verlängerte Verdauzeit.

Neben der chemisch-enzymatischen Auflösung des Zellverbundes wurden auch die rein mechanische Gewinnung vitaler Krypten unterm Dissektionsmikroskop [Mills et al., 2001] sowie die Isolierung spezifischer Zellen aus gefrorenem [Xu et al., 2002; Lechner et al., 2003] bzw. paraffineingebettetem [Kleeberger et al., 2000] Kolongewebe mittels Laser Catapulting Microdissection (LCM) erfolgreich durchgeführt, wobei die Gewinnung vitaler Krypten und Zellen mittels LCM noch nicht publiziert wurde. Die im Verlauf der praktischen Arbeit unternommenen Versuche, vitale Krypten mittels LCM aus frischem Gewebe zu gewinnen, verliefen erfolglos, da es in dem frischen Gewebe zu „Verkochungseffekten“ kam. Im Gegensatz dazu war die Isolierung vitaler Zellen aus dem oberen bzw. unteren Kryptbereich mittels Eppendorff-Mikromanipulator erfolgreich, doch wurden die für die Comet-Assay- bzw. Comet-FISH-Methode notwendigen Zellmengen nicht erhalten.

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Krypt- und Zellisolierung beruht hinsichtlich der Abtrennung der Epithelstreifen vom Kolongewebe auf der Veröffentlichung von Schwenk et al. [1992]. Der Gewebeverdau mit Collagenase/Proteinase wurde in Anlehnung an Pool-Zobel und Leucht [1997] und Liegibel et al. [2000] durchgeführt. Zur **Gewinnung der Krypten** wurde das Kolonepithel für 45-60 min statt für 10 min [Liegibel et al., 2000] verdaut, wobei die verlängerte Verdauzeit aus der Verwendung größerer Gewebestücke und Gewebemengen resultierte. Anhand des ausgearbeiteten Protokolls ließen sich Kolonkrypten isolieren, die eine gute strukturelle Integrität und Vitalität aufwiesen und sich somit in relevante Versuchssysteme einsetzen ließen. Die große Zahl von durchschnittlich 75.000 isolierten Krypten pro Gramm Kolonepithel lassen eine nachfolgende Verwendung, wie z.B. die Mikrodisektion der Krypten oder Comet-Krypt-Versuche, wünschenswert erscheinen. Neben dem in der vorliegenden Arbeit

verwendeten Collagenase/Proteinase-Verdau führen auch andere Aufarbeitungsmethoden zu vitalen Krypten mit guter struktureller Integrität. So wurde von Pedersen et al. [2000b] und Seidelin et al. [2003] der Verdau mit EDTA/EGTA und von Dzierzewicz et al. [2000] der Verdau mit Collagenase genutzt, während Mills et al. [2001] Kolonkrypten mittels Mikrodissektion isolierten. Zur Anzahl der mit der jeweiligen Isolationsmethode gewonnenen Krypten machen nur wenige Autoren konkrete Angaben. So konnten Seidlin et al. [2003] mehr als 100 intakte Krypten durch Verdau von 7 humanen Kolonbiopsien gewinnen, wobei jedoch ein Vergleich dieses Zahlenwertes mit der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Kryptzahl nicht möglich ist.

Die strukturelle Integrität der Krypten wurde im Rahmen dieser Arbeit lichtmikroskopisch überprüft und die Vitalität der Kryptzellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Die lichtmikroskopische Untersuchung der Kryptstruktur ist auch in den vorliegenden Veröffentlichungen zumeist die Methode der Wahl [Gibson et al., 1989; Seidelin et al., 2003], wohingegen für die Vitalitätsbestimmung neben dem Trypanblau-Ausschlusstest [Gibson et al., 1989] auch der Methylnitrazoleumtest [Pedersen et al., 2000a; Seidelin et al., 2003] sowie weitere Methoden [Gibson et al., 1989] zum Einsatz kommen. Dass frisch isolierte Kolonkrypten eine gute strukturelle Integrität und Vitalität aufweisen, wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit von den genannten Autoren gefunden. Ebenso wurde beschrieben, dass der Zerfall der kolorektalen Krypten bereits nach etwa 4 h einsetzte [Leschelle et al., 2002] und die Integrität der Krypten nach 24 stündiger Aufbewahrung verloren gegangen war [Seidelin et al., 2003]. Für den Verlust der Kryptintegrität wurden im Rahmen dieser Arbeit, abweichend von der Literatur, kürzere Zeitspannen von 12-16 h (bei 4° C in HBSS) gefunden. Die in den Kolonkrypten vorliegenden apoptotischen und nekrotischen Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid bestimmt. Die dabei gemachte Beobachtung, dass zu Beginn des Kryptzerfalls Apoptose einsetzte und schließlich zu einem Vitalitätsverlust führte, wurde auch von Pedersen et al. [2000a] gemacht. Diese Autoren fanden nach 24 h eine Kryptvitalität, die bei 51 % lag [Pedersen et al., 2000a]. Der Effekt, dass der Zerfall der Krypten und der damit einhergehende apoptotische Zelltod vom oberen zum unteren Kryptbereich hin fortschreitet, wurde übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit sowohl von Pedersen et al. [2000a] als auch von Seidelin et al. [2003] berichtet. Dabei wurden, wie in dieser Arbeit, Kryptzerfall, Apoptose und Zelltod semiquantitativ ausgewertet.

Wie die Gewinnung humaner Kolonkrypten, orientierte sich auch die **Gewinnung der Primärzellen** an den Publikationen von Pool-Zobel und Leucht [1997] sowie Liegibel et al. [2000]. Die Verdauzeit wurde von 30 min auf 60-120 min heraufgesetzt, sowohl aufgrund größerer Gewebestücke und Gewebemengen als auch aufgrund der sich mit längerer Verdauzeit statistisch signifikant verbessernden Zellvitalität. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit

ausgearbeitete Protokoll erlaubte dabei die Isolierung großer Mengen kolorektaler Primärzellen mit hervorragender Vitalität und geringer DNS-Basisschadensrate. So wurden aus den Kolonbiopsien etwa $0,68 \times 10^6$ Zellen je Biopsie gewonnen, die eine Vitalität von $90,0 \pm 3,8 \%$ und eine als TI-Wert gemessene Basisschadensrate von $7,0 \pm 3,1 \%$ aufwiesen. Entsprechend gute Ergebnisse wurden für die aus Kolongewebe isolierten Zellen gefunden, wobei hier durchschnittlich $45,6 \times 10^6$ Zellen je Gewebeprobe mit einer Vitalität von $89,1 \pm 5,3 \%$ und einer DNS-Basisschadensrate von $6,7 \pm 2,6 \%$ isoliert wurden. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit denen von Pool-Zobel und Leucht [1997] überein, die aus humanen Kolonbiopsien $0,63 \times 10^6$ Zellen je Biopsie mit einer Zellvitalität von $88,0 \pm 6,5 \%$ isolierten. Hinsichtlich Zellvitalität und DNS-Basisschadensrate ergaben sich für die aus Biopsiematerial bzw. Kolongewebe isolierten Zellen generell keine statistisch signifikanten Unterschiede. Allein die Gesamt-Zellmenge, die sich aus den Kolongewebeproben isolieren ließ, war größer. Diese lag in Abhängigkeit von der Probengröße bei $48,6 \times 10^6 \pm 40,8 \times 10^6$ Zellen und erlaubte parallele Versuche in verschiedenen Testsystemen oder mit unterschiedlichen Testsubstanzen.

Mit der Aufarbeitung der Kolongewebeproben wurde die Frage nach der **Aufbewahrung** nicht benötigten Primärmaterials relevant. Entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss die Aufbewahrung von primären Kolonzellen, Kolonkrypten und Epithelstreifen auf die Zellvitalität und DNS-Basisschadensrate hat. Dazu wurde das Primärmaterial entweder kurzfristig für 12-16 Stunden in HBSS auf Eis gestellt oder langfristig in DMSO- und FCS-haltigem Einfriermedium bei -130°C gelagert.

Bei beiden Aufbewahrungsarten wurde für die primären Kolonzellen ein signifikanter Vitalitätsverlust gefunden, wobei die Zellvitalität bei den auf Eis gelagerten Zellen von $89,2 \pm 4,4 \%$ auf $73,4 \pm 7,5 \%$ abnahm und bei den kryokonservierten und wieder aufgetauten Zellen von $87,3 \pm 8,3 \%$ auf $69,4 \pm 0,7 \%$. Für die kurzfristig aufbewahrten Zellen wurde zusätzlich ein Anstieg der DNS-Basisschadensrate von $8,1 \pm 3,3 \%$ auf $13,6 \pm 3,1 \%$ gefunden. Die untersuchten Aufbewahrungsmöglichkeiten stellten sowohl wegen der niedrigen Vitalität ($< 80 \%$) als auch wegen der als Schädigung anzusehenden TI-Werte ($> 10 \%$) letztlich keine Alternative zu der direkten Zellisolierung dar. Für die Kolonkrypten wurde nur die Möglichkeit der kurzfristigen Aufbewahrung untersucht, da die Kryokonservierung der Kolonepithelstreifen indirekt eine langfristige Aufbewahrung von Krypten darstellte. Wie bereits beschrieben, hatten die in HBSS aufbewahrten Krypten nach 12-16 Stunden ihre strukturelle Integrität verloren und waren größtenteils in Bruchstücke und einzelne Zellen zerfallen. Dabei wurde semiquantitativ eine Zunahme toter Zellen festgestellt, wobei sich die Zellvitalität in den Bruchstücken nicht bestimmen ließ. Kolonepithelstreifen wurden sowohl kurzfristig in HBSS aufbewahrt als auch kryokonserviert. Dabei hatte die kurzfristige Aufbewahrung der Epithelstreifen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität oder DNS-Basisschadensrate.

So lag die Vitalität der Zellen bei $92,5 \pm 2,6$ % und der im Comet-Assay bestimmte TI-Wert bei $8,3 \pm 2,1$ %. Im Gegensatz dazu fanden sich für die aus eingefrorenen Epithelstreifen gewonnenen Zellen nur knapp über 80 % liegende Vitalitäten und über 10 % liegende TI-Werte, so dass sich diese Zellen nicht für weitere Untersuchungen mittels Comet-Assay oder Comet-FISH eigneten.

Da es keine Veröffentlichungen gibt über die Auswirkung kurzfristiger oder langfristiger Aufbewahrung von primären Kolonzellen, -krypten oder -epithelstreifen auf die Vitalität und DNS-Basisschadensrate der Zellen, werden die Ergebnisse mit Daten anderer Gewebe verglichen. So wurde die Kryokonservierung primärer, aus Gewebe isolierter Zellen z. B. von Belpaeme et al. [1998] anhand von Primärzellen aus Kiemen, Leber und Nieren von Plattfischen untersucht, von Hu et al. [2002a] an Leber- und Nierenzellen von Ratten und von Miyahara et al. [2000] an Leberzellen vom Rind. In den genannten Arbeiten wurden die isolierten Einzelzellen jeweils eingefroren, wieder aufgetaut und auf Vitalität und DNS-Schäden hin untersucht. In den eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen fanden alle Autoren eine verringerte Zellvitalität und eine erhöhte DNS-Basisschadensrate im Vergleich zu frisch isolierten Zellen und bestätigten damit die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse. Darüber hinaus haben Hu et al. auch die Kryokonservierung von Gewebestücken und Zellen miteinander verglichen. Dabei fanden sie in Bezug auf Leber- und Nierengewebe von Ratten, dass das Einfrieren und Auftauen von Gewebestücken mit anschließendem Gewebeverdau zu geringeren Schäden in den Zellen führt als das Einfrieren und Auftauen von Einzelzellsuspensionen [Hu et al., 2002a]. Auch dieser Zusammenhang entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für humane Kolonprimärzellen. So zeigten kryokonservierte Primärzellsuspensionen nach dem Auftauen eine Zellvitalität von $69,4 \pm 0,7$ %, während die Vitalität der aus eingefrorenem Kolonepithel isolierten Zellen über 80 % lag.

Der Einfluss kurzfristiger Gewebeaufbewahrung im Vergleich zur langfristiger wurde von Kleinsasser et al. [2003] untersucht, indem sie Biopsien humaner Nasenmukosa für 24 h bei 4 °C bzw. -80 °C lagerten. Die Autoren fanden keine Unterschiede hinsichtlich der Zellvitalität, konnten jedoch bei den eingefrorenen Zellen signifikant höhere DNS-Schäden im Vergleich zu frisch isolierten Zellen nachweisen [Kleinsasser et al., 2003]. Diese Befunde entsprechen den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, dass die aus kryokonserviertem Kolonepithel gewonnenen Zellen zwar eine hinreichende Vitalität (> 80 %) aufwiesen, jedoch wegen der TI-Werte > 10 % als geschädigt gelten mussten. Den Einfluss der kurzfristigen Gewebeaufbewahrung untersuchten auch Everett et al., wobei sie mit humanem Magengewebe arbeiteten. Die Arbeitsgruppe fand übereinstimmend mit den Befunden dieser Arbeit, dass die Aufbewahrung von Biopsiematerial über Nacht bei 4 °C keine Auswirkung auf die Zellvitalität oder die im Comet-Assay gemessene DNS-Basisschadensrate hat [Everett et al., 2000].

Neben den Aufbewahrungsmöglichkeiten für das Primärmaterial wurde bei der Aufarbeitung der Kolongewebeproben auch der **Einfluss von Verdauzeit und Aufreinigung** auf die Vitalität und DNS-Basisschadensrate der gewonnenen Zellen untersucht. Die Inkubationszeiten für den Enzymverdau sind in der Literatur, je nachdem ob Krypten oder einzelne Zellen erhalten werden sollen, unterschiedlich gewählt und liegen zwischen 10 und 120 min [Benya et al., 1991; Pedersen et al., 2000a; Pedersen et al., 2000b; Seidelin et al., 2003]. Nur in einer Veröffentlichung wurde systematisch der Einfluss von Verdauzeit (10-120 min) und Verdautemperatur (4 °C-37 °C) auf Vitalität, Zellzahl und Anwachsverhalten isolierter Kolonkrypten bzw. Kolonprimärzellen untersucht [Seidelin et al., 2003]. Die Autoren fanden für den Verdau humaner Kolonbiopsien mit EDTA/EGTA-Puffer eine optimale Inkubationszeit von 75 min bei 21 °C, wobei sie je Biopsie durchschnittlich $0,43 \times 10^6$ Zellen isolierten, die eine mittlere Vitalität von 71,0 % aufwiesen. Verglichen damit wurden in der vorliegenden Arbeit gute Zellausbeuten ($0,68 \times 10^6$ Zellen je Biopsie) und Zellvitalitäten (90,0 %) erzielt. Eine weitere Verlängerung der Verdauzeit auf 120 min führte bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen, im Gegensatz zu den von Seidelin et al. veröffentlichten Ergebnissen, durchaus zu signifikant verbesserten Zellvitalitäten. Parallel zur Vitalitätsverbesserung verringerten sich dabei die DNS-Basisschadensraten, was allerdings statistisch nicht signifikant war. Diese beobachteten Effekte sind darauf zurückzuführen, dass der Verdau stets vom oberen zum unteren Kryptbereich fortschreitet und die jüngeren Zellen des unteren Kryptbereichs geringere DNS-Basisschadensraten aufweisen.

Die schrittweise Verbesserung von Zellvitalität und DNS-Basisschadensrate mit der Dauer der Inkubation wurde auch von Oberreuther-Moschner [2002] beschrieben, die den sukzessiven Kryptverdau für eine Trennung der Zellen nach oberem und unterem Kryptbereich nutzte. Everett et al. [2000] verfolgten die enzymatische Freisetzung epithelialer Magen­zellen mittels Comet-Assay und fanden bei längerem Gewebeverdau signifikant verringerte DNS-Schäden in den isolierten Zellen. Entsprechend dem Kolongewebeverdau erklärten Everett et al. ihre Ergebnisse damit, dass zuerst die ausdifferenzierten älteren Zellen des oberen Kryptbereichs freigesetzt würden und anschließend die jüngeren aus dem unteren Bereich der Magen­krypten, die weniger DNS-Schäden aufwiesen.

Zur Aufreinigung der aus Kolongewebe gewonnenen Zellsuspensionen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Erythrozytenlyse, die Dichtegradientenzentrifugation und die magnetische Zellseparation untersucht. Die Erythrozytenlyse mit isotonischer Ammoniumchloridlösung, die vor allem zur Aufarbeitung von Blut genutzt wird [Terstappen et al., 1989; Ide et al., 1994], war stets effektiv, da die Zellpellets der primären Kolonzellen in Anschluss an die Lyse keine Rotfärbung mehr zeigten. Auch ließen sich lichtmikroskopisch in

den Primärzellsuspensionen keine Erythrozyten mehr erkennen. Allerdings war der Lyseschritt stets mit einer z. T. signifikanten Verschlechterung der Zellvitalität verbunden, so dass von einer generellen Erythrozytenlyse abgesehen wurde. Stattdessen wurde bei der Aufarbeitung der Gewebeproben auf hinreichende Waschschriffe und vorsichtige Abtrennung der Epithelstreifen, ohne Blutgefäße zu verletzen, geachtet. Der Einfluss der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lysemethode auf die Zellvitalität und die DNS-Basisschadensrate humaner Primärzellen ist in der Literatur nicht beschrieben. Als eine weitere Möglichkeit der Primärzellaufreinigung wurde die Dichtegradientenzentrifugation mit Histopaque 1.077 untersucht. Diese brachte weder hinsichtlich der Zellvitalität noch hinsichtlich der DNS-Basisschadensrate signifikante Verbesserungen und führte zudem zu hohen und statistisch signifikanten Zellverlusten. Im Gegensatz dazu wurden die Dichtegradientenzentrifugation [Follmann et al., 2000] wie auch die sukzessive Zentrifugation [Gibson et al., 1989] erfolgreich zur Abtrennung kolorektaler Krypten von Kryptbruchstücken und vereinzelt Kolonzellen eingesetzt.

Auch die magnetische Zellseparation wird seit einigen Jahren zur Aufreinigung kolorektaler Einzelzellsuspensionen sowie zur Abtrennung epithelialer Zellen genutzt. So wurde die Selektion kolorektaler Tumorzellen mit dem MACS®-System von Martin et al. [1998] und Leinung et al. [2000] beschrieben, das erfolgreiche Arbeiten mit dem System von Dynal von Werther et al. [2000]. Die erfolgreiche Abtrennung unveränderter Epithelzellen mittels magnetgekoppelter Antikörper wurde von Osswald et al. [2003] für gastrointestinale und von StCroix et al. [2000] für kolorektale Zellen beschrieben. Letztere verwendeten bei ihren Versuchen die gleichen Antikörper, die auch im Rahmen dieser Arbeit benutzt wurden. Wieso die eigenen Versuche im Gegensatz zu den von StCroix et al. publizierten Ergebnissen erfolglos blieben, konnte nicht geklärt werden. Eine Änderung der Antigenstruktur an der Zelloberfläche, als Folge des enzymatischen Gewebeverdaus, wurde ausgeschlossen, da auch rein mechanisch aufgearbeitete Primärzellen nicht mit den beadgekoppelten Antikörpern reagierten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur **Vitalitätsbestimmung** der Primärzellen verschiedene tot-vital-Färbungen verwendet und miteinander verglichen. Die dabei genutzten Färbemethoden mit Trypanblau, FDA/Trypanblau bzw. FDA/Ethidiumbromid wurden bereits in sehr unterschiedlichen Zellmodellen verwendet. So wurden mit Trypanblau bzw. FDA/Ethidiumbromid bestimmte Vitalitäten in humanen mononukleären Blutzellen [Osnes et al., 1994], in humanen Leukozyten [Zappa et al., 1992] und in Endothelzellen der menschlichen Kornea [Madden, 1987] miteinander verglichen und FDA/Trypanblaufärbungen zur Quantifizierung apoptotischer Zellen in der Durchflusszytometrie verwendet [Reno et al., 1997]. Die Autoren fanden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Vitalitätsbestimmung mit den genannten Färbemethoden. Entsprechend dieser Ergebnisse wurden auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Einzelzellsuspensionen

zumeist keine Unterschiede zwischen den verschiedenen tot-vital-Färbungen gefunden. Nur die aus aufgetautem Kolonepithel isolierten Zellen zeigten nach Anfärbung mit FDA/Trypanblau eine gegenüber Trypanblau und FDA/Ethidiumbromid signifikant verringerte Vitalität. Eine mögliche Erklärung für den gefundenen Vitalitätsunterschied könnte ein Messfehler infolge angefärbter und mitgezählter Zelltrümmer bzw. Verunreinigungen sein.

Aus den Versuchsergebnissen zur Aufarbeitung der Kolongewebeproben kann das Fazit gezogen werden, dass humane Kolonbiopsien und humane Kolongewebeproben eine gleichermaßen gute Quelle zur Isolierung von primären Kolonzellen und -krypten sind. Dabei lassen sich Primärzellen mit hervorragender Vitalität und geringer DNS-Basisschadensrate isolieren und auch die Kolonkrypten weisen eine gute Vitalität und strukturelle Integrität auf. Bei der Gewebeaufarbeitung ist eine auf 120 min verlängerte Verdauzeit mit einer signifikant verbesserten Zellvitalität und einer tendenziell verbesserten DNS-Basisschadensrate verbunden, wohingegen die weitere Aufreinigung der Zellsuspensionen mittels Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation zu signifikant verringerter Zellvitalität (Erythrozytenlyse) bzw. hohen Zellverlusten (Dichtegradientenzentrifugation) führt. Bei der Aufbewahrung des Primärmaterials hat einzig die 12-stündige Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen bei 4 °C in HBSS keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität oder DNS-Basisschadensrate der nachfolgend isolierten Zellen. Sie stellt somit die Methode der Wahl dar, wenn Gewebematerial im Rahmen der Versuchsplanung kurzfristig aufbewahrt werden soll. Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau ist bei primären Kolonzellen den tot-vital-Färbungen mit FDA/Trypanblau bzw. FDA/Ethidiumbromid vorzuziehen, da sich die in Primärzellsuspensionen stets vorliegenden Zelltrümmer und Verunreinigungen nach Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch besser erfassen und ausschließen lassen.

5.2 Nachweis genotoxischer Effekte mittels Comet-Assay

Im zweiten Teil der Diskussion werden die mittels Comet-Assay quantifizierten Ergebnisse zur Sensitivität primärer Kolonzellen, LT97-Zellen und HT29clone19a-Zellen gegenüber der genotoxischen Wirkung von H₂O₂, Hexenal und HNE erörtert. Zur Beurteilung der durch die untersuchten Modellsubstanzen induzierten Effekte ist ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten H₂O₂-, Hexenal- und HNE-Konzentrationen mit den im menschlichen Organismus vorkommenden Konzentrationen notwendig. Dazu lassen sich einerseits die frei im Plasma und in den Zellen vorliegenden Substanzen betrachten und andererseits die aus ihnen gebildeten Addukte, die ebenfalls die jeweilige Substanzkonzentration widerspiegeln. Für H₂O₂ als Vertreter der ROS und für Hexenal und HNE als Vertreter der reaktiven Lipidperoxidationsprodukte gilt dabei gleichermaßen, dass sie aufgrund ihrer hohen Reaktivität nicht in den Zellen akkumulieren, sondern im zellulären System irreversibel mit nukleophilen

Proteinen, Enzymen und DNS-Basen abreagieren [Esterbauer et al., 1991; Eckl et al., 1993; Marnett, 2000].

Das im Rahmen dieser Arbeit als Testsubstanz verwendete H_2O_2 kommt mit Konzentrationen zwischen $2,5 \pm 0,07 \mu\text{M}$ [Banerjee et al., 2003] und $15,6 \pm 6,4 \mu\text{M}$ [Harma et al., 2003] in humanem Plasma vor. Die Konzentration des 8-oxo-dG, das etwa 5-10 % aller oxidierten DNS-Basen ausmacht [Helbock et al., 1998], wurde von Gackowski et al. [2001] in humanen Lymphozyten bestimmt, wobei die Autoren mittels HPLC 9,6 Addukte/ 10^6 dG-Moleküle fanden. Eine gut 20-fach niedrigere Konzentration dieser Addukte wurde von Collins et al. [1997] mittels Comet-Assay in Leukozyten gefunden ($0,4$ Addukte/ 10^6 dG-Moleküle). Darüber hinaus versuchten Helbock et al. die Gesamtmenge an oxidierten Basen abzuschätzen, die täglich im menschlichen Organismus entsteht, und kamen auf etwa 11.500 oxidierte DNS-Basen pro Zelle und Tag [Helbock et al., 1998; Helbock et al., 1999]. Verglichen mit den im Plasma vorliegenden H_2O_2 -Mengen liegen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen zwar über den gefundenen 2,5-15,6 μM , spiegeln jedoch in Anbetracht der nur 5 minütigen Inkubationszeit durchaus die realen Gegebenheiten wider.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lipidperoxidationsprodukte Hexenal und HNE kommen in humanem Plasma im unteren mikromolaren Bereich vor. So wurde von Rauli et al. [1998] mittels GC-MS eine HNE-Konzentration von $0,7 \mu\text{M}$ und von Selley et al. [1989] mittels HPLC-GC-MS eine vergleichbare Konzentration in Höhe von $0,68 \pm 0,41 \mu\text{M}$ gemessen. Beim Hexenal liegt die mittels GC-MS in humanem Plasma gemessene Konzentration noch unter diesen Werten und beträgt $2,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ [Mak et al., 2000]. Die von Hexenal und HNE gebildeten DNS-Addukte wurden sowohl von Eder und Schuler als auch von Wacker et al. nach ^{32}P -Postlabelling mittels HPLC quantifiziert. Für HNE lagen die Propano-DNS-Addukte in humanem Kolongewebe bei 378 ± 52 [Wacker et al., 2000] bzw. 269 ± 35 Addukten/ 10^9 Nukleotide [Wacker et al., 2002]. Für Hexenal hingegen waren in gesundem Rattendarm (Duodenum und Rektum) keine Propano-DNS-Addukte nachweisbar, die Adduktmenge lag unter der Nachweisgrenze von 300 Addukten/ 10^9 Nukleotide [Eder et al., 1999; Eder und Schuler, 2000]. Der Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Hexenal- und HNE-Konzentrationen zeigt, dass diese Substanzen im menschlichen Organismus in etwa 100-300- (HNE) bzw. 1000-3000-fach (Hexenal) niedrigeren Konzentrationen vorkommen. In diesem Zusammenhang muss aber bedacht werden, dass zu den hier untersuchten Substanzen noch eine große Zahl weiterer Lipidperoxidationsprodukte hinzukommt. So bestimmten Mak et al. [2000] die Plasmakonzentration von 22 aldehydischen Lipidperoxidationsprodukten und fanden eine Gesamtkonzentration von immerhin $6,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$. Zudem ist der menschliche Organismus lebenslang den geringen Mengen der endogen gebildeten Lipidperoxidationsprodukte ausgesetzt, so dass diese langfristig durchaus zur spontanen

Mutationsrate und zur Krebsentstehung beitragen können [Barbin, 2000]. Für die praktischen Arbeiten wurden relativ hohe Substanzkonzentrationen auch deshalb gewählt, damit innerhalb der 30 minütigen Inkubationszeit einerseits ein eindeutig genotoxischer Effekt in den untersuchten Zellen erzielt wurde, andererseits eine Überlagerung von Schadensinduktion und Reparatur weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

Die durch H_2O_2 -, Hexenal- bzw. HNE-Behandlung induzierten DNS-Schäden wurden in drei unterschiedlichen Zellsystemen untersucht. Dabei handelte es sich um unveränderte primäre Kolonzellen, LT97-Kolonadenom- und HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen, die verschiedene Stadien der humanen Kolonkarzinogenese widerspiegeln und sich sowohl in ihrer Sensitivität gegenüber ernährungsrelevanten, endogenen Risikofaktoren als auch in ihrer Reparaturkapazität unterscheiden. Mit den LT97-Kolonadenomzellen wurden erstmals Kolonzellen im Comet-Assay eingesetzt, die dem frühen Adenomstadium der kolorektalen Karzinogenese entsprechen und Aussagen zu diesem frühen Stadium der Krebsentstehung zulassen. Untersuchungen an Kolonzellen mittels Comet-Assay wurden bislang sowohl an primären Zellen von Ratte [Golzer et al., 1996; Abrahamse et al., 1999; Giovannelli et al., 2000] und Mensch [Pool-Zobel et al., 1999a; Liegibel et al., 2000; Glaab et al., 2001; Rosignoli et al., 2001; Schaeferhenrich et al., 2003a] als auch an verschiedenen humanen Kolonzelllinien durchgeführt. Die am häufigsten verwendeten Kolonzelllinien sind dabei HT29-Stammzellen [Liegibel et al., 2000; Rosignoli et al., 2001; Pool-Zobel et al., 1999a; Huycke et al., 2002], HT29clone19a-Zellen [Pool-Zobel et al., 1999b; Liegibel et al., 2000; Pool-Zobel et al., 2000; Rosignoli et al., 2001; Gleib et al., 2002] und CaCo2-Zellen [Duthie et al., 1997; Duthie und Collins, 1997; Glaab et al., 2001; Slamenova et al., 2002], die alle aus Kolonkarzinomen etabliert wurden.

Betrachtet man die genotoxische Wirkung der eingesetzten Modellsubstanzen, so ist zu bedenken, dass H_2O_2 über Hydroxylradikale ganz andere DNS-Schäden induziert als die α,β -ungesättigten Aldehyde Hexenal und HNE. So ruft H_2O_2 vor allem Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie oxidierte Basen hervor, während die Induktion von alkalilabilen Stellen und DNS-Protein-Crosslinks vernachlässigbar gering ist [Marnett, 2000; Slupphaug et al., 2003]. Im Gegensatz dazu kommt es durch Hexenal- bzw. HNE-Behandlung vor allem zur Bildung von Propano- und Etheno-DNS-Addukten und durch Umlagerung der gebildeten Addukte zur Ausbildung von alkalilabilen Stellen und DNS-Einzelstrangbrüchen [Marnett, 2000]. Die Bildung von DNS-Crosslinks durch Lipidperoxydationsprodukte ist mittels Comet-Assay nicht nachweisbar [Oberreuther-Moschner, 2002].

Diese durch H_2O_2 , Hexenal bzw. HNE induzierten Schäden lassen sich nur zum Teil mit dem Standardprotokoll des alkalischen Comet-Assays quantifizieren, mit dem Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen und DNS-Crosslinks gemessen werden. Zusätzlich werden DNS-Exzisionsreparaturstellen als Einzelstrangbrüche erfasst, nicht aber die oxidierten

Basen [Tice et al., 2000; Collins, 2002]. Im neutralen Comet-Assay, bei dem die DNS-Entwindung bei pH 8 statt pH 13 durchgeführt wird, werden hauptsächlich DNS-Doppelstrangbrüche gemessen, so dass sich durch Wahl des pH-Wertes die Art der im Comet-Assay quantifizierten Schäden bestimmen lässt. So wurden auch im Rahmen dieser Arbeit die durch H_2O_2 bzw. HNE induzierten DNS-Schäden im neutralen Comet-Assay näher charakterisiert. Es wurde gefunden, dass H_2O_2 in HT29clone19a-Zellen dosisabhängig Doppelstrangbrüche induziert, nicht jedoch das Lipidperoxidaionsprodukt HNE. Während die höchste H_2O_2 -Konzentration ($150\text{ }\mu\text{M}$) im neutralen Comet-Assay zu signifikanten Schäden führte ($\text{TI} = 20,5 \pm 2,8\%$), waren die HNE-behandelten HT29clone19a-Zellen nicht signifikant geschädigt. Die im alkalischen Comet-Assay gefundenen genotoxischen Effekte sollen im Folgenden diskutiert werden.

H_2O_2 wurde als Modellsubstanz für oxidativen Stress in zahlreichen Untersuchungen eingesetzt. In humanen Kolonzellen wurde es z. B. zur Erforschung protektiv wirkender Substanzen wie Anthocyane [Pool-Zobel et al., 1999b], Isoflavonoide und Lignane [Pool-Zobel et al., 2000], Butyrat und Acetat [Abrahamse et al., 1999; Rosignoli et al., 2001] oder Rosmarinextrakt [Slamenova et al., 2002] verwendet und auch zur Untersuchung additiver Effekte unter Zusatz von Fe-NTA [Glei et al., 2002] oder Fäzeswasser [Rieger et al., 1999] genutzt. Darüber hinaus untersuchten Pool-Zobel und Leucht [1997] H_2O_2 als Risikofaktor der kolorektalen Karzinogenese in Primärzellen von Ratte und Mensch und Pool-Zobel et al. [1999a] den Zusammenhang zwischen DNS-Strangbrüchen, oxidierten Basen und dem GSTP1-Gehalt humaner Kolonzellen. Zur Induktion von oxidativem Stress wurde H_2O_2 auch von Liegibel et al. [2000] in humanen Kolonprimärzellen, HT29Stamm- und HT29clone19a-Zellen und von Oberreuther-Moschner [2002] in Primärzellen aus Rattenkolon sowie in CaCo2-, HT29Stamm- und HT29clone19a-Zellen verwendet.

In den eigenen Arbeiten wiesen die verwendeten Zellmodelle nach Behandlung mit $0\text{--}150\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 (5 min bei 4°C) dosisabhängige DNS-Schäden auf, wobei die TI-Werte für die höchste H_2O_2 -Konzentration in den HT29clone19a-Zellen bei $32,1 \pm 8,7\%$, in den LT97-Zellen bei $30,7 \pm 6,5\%$ und in den humanen Primärzellen bei $24,3 \pm 4,3\%$ lagen. Aufgrund unterschiedlicher Inkubationsbedingungen (5 min bei 4°C [Liegibel et al., 2000; Schaeferhenrich et al., 2003a], 15 min bei 37°C [Rosignoli et al., 2001] bzw. 30 min bei 37°C [Pool-Zobel et al., 1999a]) und Auswertungsparameter (Tail-Intensity in % [Pool-Zobel et al., 1999a; Liegibel et al., 2000; Schaeferhenrich et al., 2003a], Tail-Intensity-Units [Oberreuther-Moschner, 2002] bzw. Kometenlänge [Abrahamse et al., 1999]) im Comet-Assay lassen sich die eigenen Ergebnisse in den HT29clone19a- und Primärzellen nur mit denen von Liegibel et al. [2000] vergleichen. So fanden Liegibel et al. in humanen Kolonprimärzellen den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbare DNS-Schäden, die etwa bei $\text{TI} = 25\%$ lagen ($150\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 , extrapolierte

Wert). Für die HT29clone19a-Zellen lagen die TI-Werte mit etwa 72 % (150 μM H_2O_2 , extrapolierter Wert) [Liegibel et al., 2000] jedoch weit über den eigenen Ergebnissen, was auf die Verwendung unterschiedlicher Zellpassagen der HT29clone19a-Zellen zurückzuführen sein könnte (Liegibel et al.: 13-18; im Rahmen dieser Arbeit 25-45).

Die Lipidperoxidationsprodukte Hexenal und HNE werden weitaus seltener als H_2O_2 zur Induktion von DNS-Schäden genutzt, weshalb zu ihrer genotoxischen Wirkung nur wenige Publikationen vorliegen. Für Hexenal sind dies neben den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um G. Eisenbrand [Golzer et al., 1996; Janzowski et al., 2000; Glaab et al., 2001; Janzowski et al., 2003], die sich mit Untersuchungen zur Wirkung von Hexenal in CaCo2-Zellen und Kolonprimärzellen von Ratte und Mensch befassen, die Arbeit von Oberreuther-Moschner [2002] und Pool-Zobel et al. [1999a]. Während Oberreuther-Moschner Ergebnisse in HT29Stamm- und HT29clone19a-Zellen publizierte, arbeiteten Pool-Zobel et al. ausschließlich mit HT29clone19a-Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wiesen sowohl die HT29clone19a- als auch die LT97- sowie die primären Kolonzellen nach Inkubation mit 0-1600 μM Hexenal dosisabhängige DNS-Schäden auf. Diese lagen für die höchste Hexenalkonzentration bei $17,7 \pm 8,2$ % (HT29clone19a-Zellen), bei $24,9 \pm 5,7$ % (LT97-Zellen) bzw. bei $19,6 \pm 3,0$ % (primäre Kolonzellen). Die von Pool-Zobel et al. [1999a] in HT29clone19a-Zellen quantifizierten TI-Werte lagen für niedrigere Hexenalkonzentrationen bereits über diesen Ergebnissen und erreichten Werte von $22,2 \pm 7,7$ % (400 μM) bzw. $50,9 \pm 7,2$ % (800 μM). Ursache für die unterschiedlichen Werte könnte zum einen eine sich mit höherer Zellpassage verringernde Sensitivität der Zellen sein (Pool-Zobel et al.: 13-18; im Rahmen dieser Arbeit: 25-45), zum anderen die Wahl der verwendeten Inkubationsmedien (Pool-Zobel et al.: physiologische NaCl-Lösung; im Rahmen dieser Arbeit: RPMI). Die von der Arbeitsgruppe um G. Eisenbrand an humanen Primärzellen und von Oberreuther-Moschner [2002] an HT29clone19a-Zellen durchgeführten Untersuchungen lassen sich nicht mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vergleichen, da sich Inkubationsbedingungen und Comet-Assay-Auswertungsparameter sehr deutlich unterscheiden. So variierten die Inkubationsbedingungen zwischen 5 min bei 4 °C [Oberreuther-Moschner, 2002], 30 min bei 37 °C [Golzer et al., 1996; Pool-Zobel et al., 1999a; Oberreuther-Moschner, 2002] und 60 min bei 37 °C [Janzowski et al., 2000; Glaab et al., 2001; Janzowski et al., 2003]. Ebenso unterschiedlich waren die Auswertungsparameter, wobei die Ergebnisse als DC_{50} -Konzentrationen (Konzentration, bei der 50 % der Zellen geschädigt sind) [Glaab et al., 2001], Tail-Intensity-Units [Oberreuther-Moschner, 2002], TI-Werte [Pool-Zobel et al., 1999a; Janzowski et al., 2000; Janzowski et al., 2003] oder Kometenlängen [Golzer et al., 1996] angegeben wurden. An dieser Stelle kann nur gesagt werden, dass die Hexenalwirkung sehr stark durch die Versuchsbedingungen beeinflusst wird.

Zur genotoxischen Wirkung von HNE sind ausschließlich Publikationen aus der eigenen Arbeitsgruppe erschienen. So befassten sich Ebert et al. [2001] mit der DNS-schädigenden Wirkung von HNE in Zusammenhang mit dem jeweiligen GST-Status der untersuchten Zellen (HT29-Stamm- und HT29clone19a-Zellen) und die eigenen Publikationen [Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b] betreffen den Inhalt der vorliegenden Arbeit. HNE (0-250 μ M) induzierte in den untersuchten Zellen konzentrationsabhängige DNS-Schäden, die nach Behandlung mit 250 μ M HNE für die HT29clone19a-Zellen bei $19,2 \pm 4,6$ %, für die LT97-Zellen bei $30,1 \pm 7,6$ % und für die humanen Kolonozyten bei $21,8 \pm 6,0$ % lagen. Die von Ebert et al. [2001] mit 200 μ M HNE in HT29clone19a-Zellen induzierten DNS-Schäden entsprachen mit einem TI-Wert von etwa 13 % gut den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen (TI = $16,4 \pm 4,6$ %). In Zusammenhang mit den HNE-Versuchsreihen wurde auch der Einfluss des Lösungsmittels auf die genotoxische Wirkung von HNE untersucht. Während Eder und Deininger nachwiesen, dass die Wahl des Lösungsmittels die mutagene Wirkung einiger α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen beeinflusst [Eder und Deininger, 2000; Eder und Deininger, 2002], konnte im Rahmen dieser Arbeit für die genotoxische Wirkung von HNE kein Lösungsmittelleffekt gefunden werden. Die durch EtOH- bzw. DMSO-gelöstes HNE in HT29clone19a- bzw. Kolonprimärzellen induzierten DNS-Schäden unterschieden sich nicht.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge in den verwendeten Kolonzellen ermöglichten einen Vergleich der Testsubstanzen in Hinblick auf ihre genotoxische Wirkung. Dieser ergab, dass H_2O_2 in allen drei Zellmodellen am stärksten genotoxisch wirkte, gefolgt von HNE und Hexenal. Während sich H_2O_2 und die Alkenale auf chemisch-struktureller Ebene nicht miteinander vergleichen lassen, können die Unterschiede in der DNS-schädigenden Wirkung von Hexenal und HNE auf chemische Strukturunterschiede zurückgeführt werden. So führt der induktive Effekt der Hydroxylgruppe am C4 des HNEs zu einer Verstärkung der positiven Partialladung am C3-Atom und damit zu einer erhöhten Reaktivität gegenüber zellulären Nukleophilen wie der DNS [Esterbauer et al., 1991]. Die im Rahmen dieser Arbeit für H_2O_2 und Hexenal gefundenen Genotoxizitätsunterschiede wurden für HT29Stamm-Zellen auch von Oberreuther-Moschner [2002] und für HT29clone19a-Zellen sowohl von Oberreuther-Moschner [2002] als auch von Pool-Zobel et al. [1999a] beschrieben. Letztere fanden nach Inkubation der HT29clone19a-Zellen mit 150 μ M H_2O_2 (30 min bei 37 °C) TI-Werte von $54,4 \pm 5,3$ % gegenüber TI-Werten von $50,9 \pm 7,2$ % nach Inkubation der Zellen mit 800 μ M Hexenal (30 min bei 37 °C).

Neben der Sensitivität gegenüber den untersuchten Modellsubstanzen wurden die verwendeten Zellen auch hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität untersucht, wobei diese als Persistenz der im Comet-Assay gemessenen Schäden erfasst wurde. In der Literatur liegen zur Reparatur H_2O_2 -

bzw. Hexenal-induzierter Schäden in Kolonzellen, neben den eigenen Publikationen, nur zwei Veröffentlichungen vor. Zum einen untersuchten Duthie und Collins [1997] den Einfluss des Zellzyklus auf die Reparatur H_2O_2 -induzierter Schäden in CaCo2-Zellen, zum anderen publizierten Janzowski et al. [2003] vergleichende Ergebnisse zum Reparaturverhalten Hexenal-geschädigter V97- und CaCo2-Zellen. Die Reparatur HNE-induzierter DNS-Schäden wurde bislang weder in Kolonzellen noch in anderen Zellsystemen untersucht.

Sowohl in HT29clone19a- als auch in humanen Primärzellen wurden die durch $150\ \mu M$ H_2O_2 -induzierten DNS-Schäden signifikant repariert, wobei die Reparatur über den beobachteten Zeitraum von 120 min unvollständig blieb. Sowohl der Reparaturverlauf als auch die unvollständige Reparatur lassen sich gut mit der Art der vorliegenden Schäden und den spezifischen Reparaturmechanismen erklären. Die im alkalischen Comet-Assay untersuchte Reparatur spiegelt die nach H_2O_2 -Behandlung vorliegenden Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie die vorliegenden DNS-Exzisionsreparaturstellen wider. Während die Einzelstrangbrüche unabhängig vom Zellzyklus durch Strangbruch-Ligation sowie Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt werden, hängt die Reparatur der Doppelstrangbrüche durch homologe Rekombination und nichthomologe-End-zu-End-Verknüpfung vom Zellzyklus ab [Seyffert, 2003]. So könnte die schnell verlaufende Strangbruch-Ligation der Einzelstrangbrüche in beiden Zellmodellen dazu geführt haben, dass der größte Teil der induzierten DNS-Schäden nach 30 min repariert war. Die geringere Reparaturrate zwischen 30 und 120 min Nachinkubation könnte durch die langsamere BER sowie vorliegende Exzisionsreparaturstellen erklärt werden und die nach 120 min nach wie vor vorliegenden DNS-Schäden durch die noch unvollständige Reparatur der H_2O_2 -induzierten Doppelstrangbrüche [Collins und Horvathova, 2001].

Anders als die H_2O_2 -induzierten Schäden wurden die Schäden nach Behandlung mit $400\ \mu M$ Hexenal während der 120 minütigen Inkubationszeit gleichmäßig beseitigt. Für die HT29clone19a-Zellen verlief die DNS-Reparatur dabei vollständig, während die humanen Kolonprimärzellen nach 120 min nach wie vor signifikante Schäden aufwiesen. In Hexenal-behandelten Zellen liegen vor allem Propano- und Etheno-DNS-Addukte sowie Einzelstrangbrüche vor, die durch Nukleotidexzisionsreparatur (Etheno- und Propano-Addukte), Basenexzisionsreparatur (Etheno-Addukte) bzw. Strangbruch-Ligation und BER (Einzelstrangbrüche) entfernt werden [Marnett, 2000; Chung et al., 2003; Gros et al., 2003]. Das Überwiegen der Exzisionsreparatur-Mechanismen könnte sich in dem langsamen und gleichmäßigen Reparaturverlauf widerspiegeln, der in den Hexenal-geschädigten Zellen beobachtet wurde.

Die Reparatur der durch Behandlung mit $150\ \mu M$ HNE gesetzten DNS-Schäden in HT29clone19a- und primären Kolonzellen zeigte einen von der Reparatur der H_2O_2 - bzw. Hexenal-induzierten Schäden abweichenden Verlauf. Während der ersten 60 min stiegen in

beiden Zellmodellen die DNS-Schäden weiter an, um schließlich nach 60-120 min tendenziell (HT29clone19a-Zellen) bzw. signifikant (primäre Kolonzellen) abzunehmen. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle waren die Zellen jedoch in beiden Versuchsreihen zum Zeitpunkt $t = 120$ min noch signifikant geschädigt. Wie nach Hexenalbehandlung liegen auch nach HNE-Schädigung vor allem Propano- und Etheno-DNS-Addukte sowie Einzelstrangbrüche vor, die überwiegend durch Exzisionsreparatur entfernt werden. Aus der Überlegung heraus, dass HNE-induzierte Propano-dG-Addukte die beobachtete Reparaturkinetik erklären könnten, wurden von Kooperationspartnern an der Universität Würzburg die während der Reparatur in primären Kolonzellen vorliegenden Propano-dG-Addukte quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Propano-dG-Adduktmengen der HNE-behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen nicht signifikant erhöht waren und die Adduktmengen in den unbehandelten Zellen mit durchschnittlich etwa 122 Addukten/ 10^9 Nukleotide insgesamt unter den normalerweise in gesundem Kolongewebe vorliegenden Mengen lagen (378 ± 52 [Wacker et al., 2000] bzw. 269 ± 35 Addukten/ 10^9 Nukleotide [Wacker et al., 2002]). Diese Befunde konnten nicht geklärt werden. Ein möglicher Einfluss der Etheno-dG-Addukte auf die Reparatur HNE-induzierter DNS-Schäden wurde nicht untersucht, da Bartsch et al. [1994] in verschiedenen Säugetieren nachweisen konnten, dass das Niveau der durch Lipidperoxidation gebildeten Etheno-DNS-Addukte generell unter dem der Propano-DNS-Addukte liegt.

Im Folgenden werden zwei weitere mögliche Ursachen für den beobachteten Reparaturverlauf diskutiert. Zum einen könnte es sich bei den während der Reparaturzeit ansteigenden und wieder abfallenden TI-Werten um intermediäre Strangbrüche handeln, die eine reparaturbedingt niedrige Nukleotidkonzentration widerspiegeln. Dieser Zusammenhang wurde von Fairbairn et al. [1995] für die Reparatur UV-B-induzierter Schäden in Lymphozyten beschrieben. So könnten nicht ausreichende Nukleotidmengen das Schließen der während der Exzisionsreparatur entstandenen Lücken im DNS-Rückrat verzögern und dadurch zu einem vorübergehenden Anstieg der mittels Comet-Assay detektierbaren Strangbrüche führen. Zum anderen fanden Janzowski et al. [2003], dass durch $100 \mu\text{M}$ Hexenal induzierte Schäden in V97-Zellen nach 3 h größtenteils repariert waren, während sich für die Hexenal-behandelten CaCo2-Zellen ein deutlicher Anstieg der DNS-Schäden ergab. Diesen Anstieg erklärten die Autoren durch sekundäre oxidative Schäden, die aufgrund hexenal-induzierter GSH-Depletion während der Reparaturzeit entstanden waren. Analog könnten sekundär während der Reparaturzeit induzierte DNS-Schäden zu dem beobachteten Reparaturverlauf in den HNE-geschädigten Zellen geführt haben.

Auch in LT97-Zellen wurden Versuchsreihen zur Reparatur zuvor induzierter DNS-Schäden durchgeführt. Jedoch stiegen hier die durch H_2O_2 - bzw. HNE induzierten DNS-Schäden im Verlauf der 120 minütigen Inkubation, die eine Reparatur ermöglichen sollte, weiter an. Dieser Anstieg war nicht nur in den mit den Modellsubstanzen behandelten Zellen sondern auch in den

Kontrollzellen zu beobachten. Neben den ansteigenden DNS-Schäden nahm die Zellvitalität über die Zeit ab, fiel allerdings nicht unter 70 %. Die beobachteten Effekte könnten aus der für die Versuchsdurchführung notwendigen Vereinzelung der LT97-Zellen resultieren, welche nach Verlust der Zell-Zell-Kontakte wahrscheinlich bald ihre DNS-Reparaturaktivität und Vitalität verlieren [Frau Prof. Marian, pers. Mitteilung].

Die vorliegenden Ergebnisse zur genotoxischen Wirkung von H_2O_2 , Hexenal und HNE in HT29clone19a-, LT97- und primären Kolonzellen ermöglichen einen Vergleich der jeweiligen Zellsensitivitäten und damit eine genauere Charakterisierung der Zellen. Zudem ergibt sich erstmalig die Einordnung der neu etablierten LT97-Kolonadenomzelllinie. Die erhaltenen Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die LT97-Kolonadenomzellen, sowohl im Vergleich zu den primären Kolonzellen als auch zu den HT29clone19a-Zellen, eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Lipidperoxidationsprodukten aufweisen. Gegenüber H_2O_2 zeigen sich die LT97-Zellen jedoch nicht sensitiver. So ergab der Vergleich mit den HT29clone19a-Zellen keine signifikanten Unterschiede und der Vergleich mit den kolorektalen Primärzellen ein uneinheitliches Bild, da in diesem Fall die LT97-Zellen nach Schädigung mit $150 \mu\text{M}$ H_2O_2 empfindlicher und nach Schädigung mit $37,5 \mu\text{M}$ H_2O_2 unempfindlicher als die Primärzellen reagierten. Allerdings wiesen die HT29clone19a-Zellen nach Schädigung mit dem als Modellsubstanz für ROS verwendeten H_2O_2 eine signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber den Primärzellen auf.

Die nach Inkubation mit H_2O_2 für HT29clone19a- und humane Primärzellen gefundene Sensitivitätsabfolge bestätigt die von Liegibel et al. [2000] publizierten Ergebnisse. Auch hier reagierten die HT29clone19a-Zellen nach Schädigung mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 (5 min bei 4°C) empfindlicher als die humanen Kolonprimärzellen. Die ebenfalls von Liegibel et al. untersuchten HT29-Stammzellen nahmen eine Zwischenposition ein. Eine abweichende Reihenfolge in den Zellsensitivitäten wurde von Rosignoli et al. [2001] gefunden, wobei die Autoren die höchsten DNS-Schäden in humanen Primärzellen fanden, gefolgt von HT29clone19a- und HT29-Stammzellen. Hier lassen die Inkubationsbedingungen ($15 \mu\text{M}$ H_2O_2 ; 15 min bei 37°C) sowie die in der Publikation abgebildeten Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge jedoch vermuten, dass sich Schadinduktion und Reparatur überlagerten und die publizierten Ergebnisse sowohl Sensitivität als auch Reparaturaktivität der Zellen repräsentieren. Die H_2O_2 -Sensitivität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kolonzellen wurde 2003 publiziert, ebenso die Ergebnisse nach HNE-Inkubation [Schaeferhenrich et al., 2003b]. Für die Sensitivität der hier untersuchten Kolonzellen gegenüber Hexenal oder HNE liegen von anderen Arbeitsgruppen keine vergleichenden Untersuchungen vor.

Um Untersuchungsergebnisse zur Kolonkarzinogenese richtig einzuschätzen, muss berücksichtigt werden, dass primäre Rattenkolonozyten gegenüber genotoxischen Noxen andere

Sensitivitäten aufweisen als humane Kolonozyten. So fanden sowohl Pool-Zobel und Leucht [1997] als auch Abrahamse et al. [1999], dass aus Rattenkolon isolierte Primärzellen gegenüber H_2O_2 -Schädigung unempfindlicher reagierten als humane Kolonepithelzellen, wohingegen die primären Kolonzellen von Ratte und Mensch gegenüber Hexenalbehandlung gleich sensitiv reagierten [Golzer et al., 1996]. Darüber hinaus untersuchten Pool-Zobel und Leucht [1997] die spezies-spezifische Genotoxizität weiterer Risikofaktoren und fanden z.B. eine erhöhte Sensitivität humaner Kolonozyten gegenüber Rattenkolonozyten nach Behandlung der Zellen mit MNNG (N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin) und eine verringerte Sensitivität nach Behandlung der Zellen mit PhiP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin). Diese beispielhaft aufgeführten Veröffentlichungen unterstreichen die absolute Notwendigkeit, Fragestellungen zur humanen Kolonkarzinogenese an humanen Kolonzellen zu untersuchen.

Die höhere Empfindlichkeit der LT97-Zellen gegenüber der genotoxischen Wirkung von Hexenal und HNE hängt unter anderem von zellspezifischen Unterschieden in den GSH-Konzentrationen und den jeweiligen Mustern und Aktivitäten der GST-Isoenzyme ab. So konnten Glaab et al. [2001] und Janzowski et al. [2000] für Hexenal und andere α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen eine selektive GSH-Depletion in V79-, CaCo2- und primären Kolonzellen nachweisen und zeigen, dass das Ausmaß derselben mit der zellspezifisch genotoxischen Wirkung der jeweiligen Substanzen verbunden war. Zusätzlich untersuchten Janzowski et al. [2003] verschiedene α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen in CaCo2-Zellen und fanden für Hexenal und Zimtaldehyd einen zeitverzögerten, durch GSH-Depletion ausgelösten Anstieg oxidativer Purinbasen. Dieser Befund zeigt die Möglichkeit sekundärer genotoxischer Schäden auf, die durch Hexenal- bzw. HNE-Behandlung der Zellen induziert werden können. Für HNE wurde der Zusammenhang zwischen genotoxischem Potential und GST-Aktivität in HT29-Stammzellen und HT29clone19a-Zellen von Ebert et al. [2001] untersucht, wobei der Butyrat-induzierte Anstieg der GST-Aktivität zu einer Verringerung der genotoxischen Wirkung des HNEs führte. Von M. Ebert ist auch der GST/GSH-Status für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen bestimmt und publiziert worden (Tabelle 12) [Schaeferhenrich et al., 2003b].

Tabelle 12: GST/GSH-Status der HT29clone19a-, LT97- und primären Kolonzzellen.

Zellen	GST-Aktivität [nmol × min⁻¹ × mg Protein⁻¹]	GSTP1-Protein [ng pro mg Protein]	GSH [nmol pro 10⁶ Zellen]
Primäre Kolonzzellen	139±9 ^a	1330±170 ^a	5,0 ± 2,7 ^b
LT97-Zellen	350±160 (n=6)	2775±1313 (n=13)	1.91±0.23 (n=5)
HT29clone19a-Zellen	407±64 (n= 26)	5555±1245 (n= 19)	6.29±1.1 (n=15)

Angaben als MW ± SD. ^a [Peters et al., 1992]; ^b [Glaab et al., 2001].

Der GSH-Status in den Zellen stimmt gut mit der jeweiligen Empfindlichkeit der Kolonzzellen gegenüber Hexenal bzw. HNE überein. So wurden in LT97-Zellen 1,91 ± 0,23 nmol, in HT29clone19a-Zellen 6,29 ± 1,1 nmol und in primären Kolonzzellen 5,0 ± 2,7 nmol [Glaab et al., 2001] GSH je 10⁶ Zellen gefunden. Für die HT29clone19a- und die LT97-Zellen entsprechen auch die GST-Aktivität und die Mengen an GSTP1 den gegenüber Hexenal bzw. HNE gefundenen Zellsensitivitäten. So war die GST-Aktivität in den HT29clone19a-Zellen mit 407 ± 64 nmol/min pro mg Protein größer als in den LT97-Zellen (350 ± 160 nmol/min pro mg Protein). Entsprechend unterschieden sich die Werte für die GSTP1-Proteinmengen, die bei 5555 ± 1245 ng pro mg Protein (HT29clone19a-Zellen) und 2775 ± 1313 ng pro mg Protein (LT97-Zellen) lagen. Für die primären Kolonzzellen ergaben sich für GST-Aktivität und GSTP1-Protein Werte, die unter denen der verwendeten Zelllinien lagen und nicht mit der Empfindlichkeit gegenüber den untersuchten Lipidperoxidationsprodukten korrelierten.

Hinsichtlich der Comet-Assay-Versuche lässt sich zusammenfassend festhalten, dass H₂O₂, Hexenal und HNE in den untersuchten Zellsystemen dosisabhängig genotoxisch wirken. Dabei ist die Genotoxizität des H₂O₂ in allen Zellen am stärksten, gefolgt von HNE und Hexenal. Hinsichtlich der Reparaturversuche kann beobachtet werden, dass die H₂O₂- und Hexenal-induzierten Schäden sowohl in HT29clone19a- als auch in primären Kolonzzellen innerhalb von 120 min fast vollständig repariert werden. Hingegen unterliegen die HNE-induzierten Schäden in den HT29clone19a- und den primären Kolonzzellen einer langsameren Reparatur, wobei dieser Reparaturverlauf nicht mit der Bildung von Propano-dG-Addukten in Zusammenhang steht. Im Gegensatz zu den HT29clone19a- und den Primärzellen eignen sich die LT97-Zellen nicht für Reparaturversuche und zeigen als vereinzelte Zellen über die 120 minütige Inkubationszeit einen Verlust von Zellvitalität und Reparaturaktivität. Der Vergleich der Zellsensitivitäten hinsichtlich der induzierten Schäden an der Gesamt-DNS zeigt, dass die HT29clone19a-Zellen nach Inkubation mit H₂O₂ signifikant höhere DNS-Schäden aufweisen als die primären Kolonzzellen, sich jedoch nicht von den LT97-Zellen unterscheiden. Hingegen zeigen die LT97-Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Lipidperoxidationsprodukten und weisen nach Behandlung mit Hexenal bzw. HNE signifikant höhere DNS-Schäden als die HT29clone19a-

oder Primärzellen auf. Die unterschiedlichen Sensitivitäten der HT29clone19a-, LT97- und Kolonprimärzellen gegenüber Hexenal und HNE lassen sich recht gut durch den jeweiligen GST/GSH-Status der Zellen erklären.

5.3 Nachweis genspezifischer Effekte mittels Comet-FISH

Während sich der Comet-Assay in den letzten Jahren zu einer Standardtechnik in vielen Bereichen der experimentellen Krebsforschung entwickelt hat [Collins, 2002], ist die Comet-FISH Methode noch relativ jung und wird nur in wenigen Laboren eingesetzt. Nach der erstmaligen Beschreibung der Methode durch Santos et al. [1997], finden sich in der Literatur hauptsächlich Veröffentlichungen aus den Arbeitsgruppen von McKelvey-Martin [McKelvey-Martin et al., 1998; McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b], Greulich [Rapp et al., 1999; Bock et al., 1999; Rapp et al., 2000] und Pool-Zobel [Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b] und nur wenige sonstige Veröffentlichungen [Menke et al., 2000; Fernandez et al., 2001]. Im dritten Teil der Diskussion werden die hier erhaltenen Comet-FISH-Ergebnisse vor dem Hintergrund dieser Publikationen diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die spezifische Sensitivität der für die Kolonkarzinogenese relevanten Gene *APC*-, *KRAS*- und *TP53* gegenüber den getesteten Modellsubstanzen in primären Kolon- bzw. LT97-Zellen untersucht.

Vor Beginn der Comet-FISH-Versuche wurde sichergestellt, dass sich die im Comet-Assay untersuchten Zellen auch für den Nachweis genspezifischer Schäden mittels FISH eignen. Dabei war für die Auswertung der Comet-FISH-OT vor allem ein stabiler, diploider Karyotyp wichtig, da nur so für jede Zelle die gleiche Anzahl von zwei theoretisch zu erwartenden Hybridisierungssignalen feststand. Bei den kolorektalen Primärzellen, die aus histologisch normal erscheinendem Kolongewebe isoliert wurden, konnte davon ausgegangen werden, dass ein normaler, diploider Karyotyp vorlag. Der Karyotyp für die verwendeten Zelllinien hingegen war nicht bekannt und wurde sowohl für die HT29clone19a-Kolonkarzinomzellen als auch für die LT97-Kolonadenomzellen von einem Kooperationspartner bestimmt und publiziert [Kuechler et al., 2003; Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b].

Für die HT29clone19a-Zellen ergab sich dabei ein heterogener Karyotyp, der die wesentlichen Chromosomenaberrationen der HT29-Stammzellen aufweist [Ghadimi et al., 2000; Abdel-Rahman et al., 2001; Kawai et al., 2002]. Hierzu zählt ein nahezu triploider Chromosomensatz mit vielen Trisomien und einer Chromosomenanzahl von 64-69 in den einzelnen Zellen. Weiterhin fanden Kuechler et al. [2003] eine große Variation zwischen den einzelnen Metaphasenkernen, die auch schon für die Stammzellen beschrieben worden war [Ghadimi et al., 2000; Abdel-Rahman et al., 2001; Kawai et al., 2002]. Im Vergleich zu dem von Kawai et al. [2002] bestimmten Karyotyp der Stammzellen fanden Kuechler et al. [2003] im Subklon zehn

zusätzliche chromosomale Aberrationen. Aufgrund dieses heterogenen Karyotyps, in dem auch die interessierenden Chromosomen 5, 12 und 17 von Zelle zu Zelle in unterschiedlicher Anzahl vorlagen, eigneten sich die HT29clone19a-Zellen nicht für Comet-FISH-Versuche. Für die 1997 etablierte LT97-Kolonadenomzelllinie ergab die Karyotypisierung mittels 24-Farben-FISH, dass die Zelllinie aus zwei Klonen bestand, die im Verhältnis 1:1 vorkamen. Beide Klone wiesen eine Translokation zwischen Chromosom 7 und 17 und ein verändertes Chromosom 1 auf, wobei der eine Klon ein Isochromosom 1q besaß, der andere eine dizentrische Translokation des langen Arms von Chromosom 1 und 18. In Summe wiesen die LT97-Zellen jedoch einen relativ stabilen Chromosomensatz mit 46-50 Chromosomen je Zelle und eine sehr geringe Intermetaphasenvariation auf [Schaeferhenrich et al., 2003b]. Der Karyotyp der LT97-Zellen blieb auch nach höheren Passagen unverändert stabil [Kuechler et al., unveröffentlichte Ergebnisse]. Da der Chromosomensatz nahezu diploid war und die im Rahmen dieser Arbeit interessierenden Chromosomen 5, 12 und 17 nicht von chromosomalen Aberrationen betroffen waren, wurden die LT97-Kolonadenomzellen wie auch die primären humanen Kolonzellen für die Comet-FISH-Versuche verwendet.

Die Comet-FISH-Technik bietet gegenüber dem einfachen Comet-Assay den Vorteil, dass über die gesamtgenomische Schädigung hinaus auch Aussagen zur individuellen Empfindlichkeit bestimmter Genomabschnitte erhalten werden. Hierdurch ergeben sich neue Einblicke in die Organisation des Zellkerns [Santos et al., 1997], in die DNS-Synthese und -Reparatur [McKelvey-Martin et al., 1998] sowie in die Sensitivitäten bestimmter Chromosomen bzw. Gene gegenüber schädigenden Noxen [Rapp et al., 2000; McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b; Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b]. Als physikalische Noxen kamen bisher UV-A-Strahlung [Rapp et al., 1999; Bock et al., 1999; Rapp et al., 2000], Röntgenstrahlen [Fernandez et al., 2001] und γ -Strahlung [McKelvey-Martin et al., 1998; McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b] zum Einsatz, als chemische Noxen wurden von Menke et al. [2000] DNase, *FokI* (Restriktionsendonuklease) bzw. *EcoRI* (Restriktionsendonuklease) und in eigenen Arbeiten H_2O_2 , Hexenal und HNE [Schaeferhenrich et al., 2003a; Schaeferhenrich et al., 2003b] zur spezifischen DNS-Schädigung verwendet.

Auch die in den jeweiligen Arbeiten verwendeten Hybridisierungsproben unterschieden sich. So wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neben einer kommerziellen *TP53*-Sonde kommerziell nicht erhältliche, durch Mikrodissektion gewonnene DNS-Sonden für das *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen verwendet. Die Untersuchungen an *APC* und *KRAS* wurden überhaupt erst durch die Bereitstellung von Sonden durch einen Kooperationspartner möglich, da entsprechende Hybridisierungsproben im Handel nicht erhältlich sind. Während die Arbeitsgruppe McKelvey-Martin auch mit Hybridisierungsproben für das *TP53*-Gen arbeitet, werden von der

Arbeitsgruppe Greulich neben *TP53* vor allem Ganzchromosomenproben, Zentromerproben und Telomerproben verwendet.

Neben den methodischen Erwägungen stellt sich generell die Frage nach der Aussagekraft der mittels Comet-FISH erhaltenen Ergebnisse. Diesbezüglich muss der Feststellung von A.R. Collins, dass die Comet-FISH-Methode wohl funktioniere, aber neben schönen Bildern keine weitergehenden Informationen liefere [Collins, 2002], klar widersprochen werden. Zwar gibt es durchaus Veröffentlichungen, die beispielhaft mit DNS-Sonden hybridisierte Zellen abbilden und auf weitere Entwicklungsmöglichkeiten verweisen [Harreus et al., 2002], doch bemühen sich die Autoren aller übrigen Publikationen um eine fundierte Datenbasis, eine solide statistische Auswertung und eine nachvollziehbare Diskussion der jeweiligen Ergebnisse. Hinsichtlich der Datenbasis wurden in den genannten Publikationen 30-100 Zellen pro OT bei ein bis vier Wiederholungsversuchen ausgewertet. Die Zahl der im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewerteten 100-150 hybridisierten Zellen pro OT bei drei bis vier Wiederholungsversuchen liegt dabei vergleichsweise hoch. In Bezug auf Auswertung und Interpretation sind für die Comet-FISH-Technik nach wie vor Fragen zu klären. So fehlt bislang eine einheitliche Quantifizierung mittels eines computergestützten Auswertungsverfahrens. Am einfachsten ist sicher die Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, wenn eine große Zahl fluoreszierender Sonden an die Kometen-DNS bindet und sich damit eine Comet-Assay-Auswertungssoftware nutzen lässt. Erfolgreich eingesetzt wurde dieses u.a. von Menke et al. [2000], die hybridisierte *Fok1*-Elemente oder Telomerwiederholungen in DNase, *EcoR1* bzw. *Fok1* behandelten Vicia Faba Zellen parallel zum Comet-Assay auswerteten. Ebenso wurden von Fernandez et al. [2001] FISH-Experimente zur Detektion von DNS-Strangbrüchen, in denen mit Röntgenstrahlung geschädigte humane Leukozyten mit Sonden für das ganze Genom hybridisiert vorlagen, mittels Comet-Assay-Software quantifiziert.

Um darüber hinaus quantitative Aussagen zu spezifischen Schäden in bestimmten Genomabschnitten zu erhalten, bedarf es der Auszählung und Auswertung der einzelnen Hybridisierungssignale in den Zellen und Kometen. So wertete die Arbeitsgruppe McKelvey-Martin in Versuchen mit hypertetraploiden Zellen einer Blasenkrebszelllinie (RT4) 2-15 Signale je Zelle aus [McKenna et al., 2003a; McKenna et al., 2003b] und die Arbeitsgruppe Greulich in Versuchen mit humanen Lymphozyten zwei Signale je Zelle [Rapp et al., 1999; Rapp et al., 2000]. Wie in der Arbeitsgruppe Greulich wurde auch im Rahmen dieser Arbeit Wert darauf gelegt, dass die für die Comet-FISH-Versuche verwendeten Zellen einen diploiden Chromosomensatz und damit, sofern kein gebrochenes Signal vorlag, konstant zwei Signale pro Zelle aufwiesen. McKenna et al. fanden bei der Auswertung ihrer γ -bestrahlten RT4-Zellen eine gegenüber der Gesamt-DNS erhöhte genspezifische Sensitivität des untersuchten *TP53*-Gens. Die genspezifischen Schäden wurden anhand steigender Gesamtsignalzahlen im

Kometenschweif quantifiziert und mit Brüchen in der *TP53*-Genregion begründet, wobei McKenna et al. in ungeschädigten RT4-Zellen 2-10 und in geschädigten Zellen 2-15 *TP53*-Signale auswerteten [McKenna et al., 2003a]. Die Reparatur der induzierten Schäden und speziell der *TP53*-Genregion wurde analog anhand wieder abnehmender Gesamtsignalzahlen im Kometenschweif quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass das *TP53*-Gen nicht nur sensitiver als die Gesamt-DNS auf Schädigung durch γ -Strahlen reagierte, sondern auch eine genspezifisch höhere Reparaturkapazität aufwies [McKenna et al., 2003a]. Trotz Verwendung einer Zelllinie mit hypertetraploidem Chromosomensatz und anderer Auswertungsmodalitäten stimmen die von McKenna et al. [2003a] für das *TP53*-Gen getroffenen Aussagen, dass die *TP53*-Genregion eine gegenüber der Gesamt-DNS erhöhte Empfindlichkeit aufweist, gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein.

Im Gegensatz zu der Auswertung von McKenna et al. wurden in den Arbeiten von Bock et al. und Rapp et al. entsprechend dem diploiden Chromosomensatz der verwendeten Zellen stets zwei Signale pro Zelle erwartet [Rapp et al., 1999 ; Bock et al., 1999 ; Rapp et al., 2000]. Zusätzlich auftretende Signale wurden dahingehend gedeutet, dass in den jeweils untersuchten Chromosomen bzw. Genomabschnitten Brüche aufgetreten waren. Gebrochene Fluoreszenzsignale wurden auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, wobei einzelne Zellen maximal drei Hybridisierungssignale aufwiesen. Dabei lagen stets zwei kleinere Signalbruchstücke in Elektrophoreserichtung hintereinander angeordnet, so dass auch die Signalanordnung auf einen direkten Bruch in dem untersuchten Gen schließen ließ. In den verwendeten Kolonzellen wiesen durchschnittlich 2,2 % der untersuchten Zellen gebrochene Signale auf, unabhängig von der Art der Gensonden. Ebenso wenig wurden Unterschiede zwischen den verwendeten Zellmodellen festgestellt. Angesichts der Tatsache, dass die untersuchten Gene während der Kolonkarzinogenese bevorzugt von Mutationen getroffen werden, erscheint der Anteil an Kolonzellen, die gebrochene Signale aufwiesen, relativ gering. Es ist durchaus möglich, dass mehr direkte Genbrüche aufgetreten sind, aber die Bruchstücke nicht als zwei voneinander getrennte Fluoreszenzsignale zu erkennen waren oder dass die entstandenen Bruchstücke zu klein waren um fluoreszenzmikroskopisch detektiert zu werden.

Als ein weiterer Parameter der Comet-FISH-Untersuchungen wurde in dieser Arbeit sowie von Rapp et al. [2000] und McKelvey-Martin et al. [1998] die Hybridisierungseffizienz bestimmt. Diese betrug für die verwendeten *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden durchschnittlich $81,9 \pm 3,6$ % und entsprach damit gut den von Rapp et al. für Ganzchromosomenproben (92 %), Zentromerproben (82 %) bzw. Telomerproben (81 %) veröffentlichten Werten [Rapp et al., 2000]. Einen höheren Wert von 93-95 % korrekt hybridisierten *TP53*-Sonden fanden McKelvey-Martin et al. [1998] in den von ihnen untersuchten HT1376-Zellen. Die in der vorliegenden Arbeit erreichte Hybridisierungseffizienz liegt durchaus im Rahmen, wobei sicherlich eine

Optimierung durch Variation von Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie Temperatur und Stringenz der Waschschritte möglich wäre. Dabei müsste zum einen eine möglichst vollständige Hybridisierung der Proben-DNS mit der Ziel-DNS der Zellen erreicht und zum anderen eine falsch-positive Hybridisierung vermieden werden.

Das primäre Untersuchungsziel der Comet-FISH-Versuche war die Erfassung genspezifischer Schäden in den H₂O₂-, Hexenal- bzw. HNE-behandelten Kolonzellen. Als Maß für die *APC*-, *KRAS*- bzw. *TP53*-spezifischen Schäden diente die Auswanderung der jeweiligen FISH-Signale in den Kometenschweif der geschädigten Zellen. Anhand dieser waren in 9 von 18 Versuchen signifikante genspezifische Schäden nachweisbar (siehe Tabelle 9), während nur etwa 1% der Signale einen direkten Bruch aufwies. Die in Tabelle 9 zusammengefassten signifikanten Unterschiede zwischen spezifischen und globalen DNS-Schäden zeigen, dass vor allem die Lipidperoxidaionsprodukte Hexenal und HNE genspezifische Schäden induzierten. In den primären Kolonzellen galt dies für alle untersuchten Gene, in den LT97-Zellen nur für das *TP53*-Gen. Die vermehrte Auswanderung der *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gene in den Kometenschweif geschädigter Zellen ist mit einer stärkeren Schädigung der jeweiligen Genregion im Verhältnis zur gesamten DNS zu erklären. Die untersuchten Substanzen greifen also bevorzugt an bestimmten Stellen des Genoms an (engl. „hot spot“), so dass man hinsichtlich der untersuchten Gene von genomischen „hot-spots“ sprechen könnte, die hoch sensitiv auf Lipidperoxidaionsprodukte reagieren.

Ein Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gene hinsichtlich der genspezifischen Schäden ergibt, sieht man von den H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen ab, einen einheitlichen Trend. So reagierte *TP53* deutlich sensitiver als *APC* oder *KRAS*, während zwischen den letzteren keine Unterschiede festzustellen waren. Allein die H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen bildeten eine Ausnahme, da hier das *APC*-Gen signifikant empfindlicher reagierte als die beiden anderen Gene. Für diese Beobachtung konnte keine Erklärung gefunden werden. Die Feststellung, dass das *TP53*-Gen sensitiver auf genspezifische Schäden reagiert als das *APC*- bzw. *KRAS*-Gen, entspricht den epidemiologischen Beobachtungen, dass das *TP53*-Gen in Tumorerkrankungen mit Abstand am häufigsten von Mutationen betroffen ist. Allerdings stehen die ermittelten Gensensitivitäten im Widerspruch zum Mehrstufenmodell der Kolonkarzinogenese nach Fearon und Vogelstein [1990], wonach das *APC*-Gen am empfindlichsten reagieren sollte, da es im Prozess der Darmkrebsentstehung als erstes Mutationen aufweist. Einen möglichen Erklärungsansatz liefert hier die von McKenna et al. mittels Comet-FISH ermittelte *TP53*-spezifische Reparaturrate [McKenna et al., 2003a], die für eine endgültige Bewertung der genspezifischen Sensitivitäten berücksichtigt werden muss. Entsprechende Untersuchungen zur genspezifischen Reparatur des *APC*- bzw. *KRAS*-Gens liegen bislang nicht vor.

Betrachtet man nun die genspezifischen Sensitivitäten der untersuchten Zellen, so ist bemerkenswert, dass die primären Kolonzellen empfindlicher als die LT97-Zellen reagierten oder zumindest eine gleiche Empfindlichkeit aufwiesen. Eine tabellarische Zusammenstellung der ermittelten Sensitivitäten gegenüber der Induktion genspezifischer bzw. genereller DNS-Schäden liefert Tabelle 13.

Tabelle 13: Genspezifische und generelle DNS-Schäden in den untersuchten Kolonzellen.

	Primäre Kolonzellen				LT97-Zellen				HT29clone19a-Zellen			
	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	Gesamt-DNS	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	Gesamt-DNS	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>	Gesamt-DNS
H₂O₂												
Hexenal												
HNE												

Dargestellt sind die Sensitivitäten der untersuchten Kolonzellen gegenüber der Induktion genspezifischer bzw. genereller DNS-Schäden. Grau hinterlegt sind signifikant höhere Empfindlichkeiten der Zellen gegenüber den jeweiligen Noxen. Grau-schraffierte Flächen markieren die fehlenden Untersuchungen zur genspezifischen Empfindlichkeit der HT29clone19a-Zellen.

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass die unveränderten Primärzellen im Anfangsstadium der Karzinogenese besonders sensitiv gegenüber genspezifischen Schäden durch Lipidperoxidationsprodukte (Sensitivität gegenüber HNE-induzierten Schäden im *APC*- und *KRAS*-Gen) und ROS (Sensitivität gegenüber H₂O₂-induzierten Schäden im *KRAS*- und *TP53*-Gen) reagieren. Bei Zellen im Adenomstadium (LT97-Zellen) hingegen reagiert die Gesamt-DNS besonders empfindlich auf genotoxische Noxen. In den Zellen des Karzinomstadiums (HT29clone19a-Zellen) schließlich zeigt die Gesamt-DNS die größte Sensitivität gegenüber ROS. Diese wechselnden Zellsensitivitäten stimmen gut mit der Tatsache überein, dass es im Laufe der Tumorentwicklung zu einer zunehmenden genomischen Instabilität kommt. So treten im Rahmen der Kolonkarzinogenese nach Mutationen im *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen Veränderungen in DNS-Reparaturgenen, wie den MMR-Genen, auf. Letzteres führt zu einer mangelhaften Reparatur von DNS-Schäden und schließlich zu einer generellen Anhäufung von Schäden und Mutationen in der gesamten DNS (Vogelstein et al., 2000).

Die Frage, ob die durch unterschiedliche Noxen induzierten DNS-Schäden zufällig verteilt im Genom auftreten oder nach bestimmten Mustern induziert werden, wurde bislang vor allem für physikalische Noxen untersucht. So wurde für UV-C- und ionisierende Strahlung gefunden, dass die DNS-Schäden keine zufällige Verteilung aufweisen [Sage, 1993; Cremer et al., 1996; Johnson et al., 1999], sondern von der Chromosomenstruktur, Modifikationen der Genaktivität oder der lokal spezifischen Aktivität von Reparaturenzymen abhängen [Wolffe, 1994; Diculescu, 1997]. Auch für Schäden durch UV-A-Strahlung wurde ein Schädigungsmuster beobachtet [Rapp et al., 2000]. So fanden die Autoren in Comet-FISH-Untersuchungen mit Ganzchromosomenproben (Chromosom1-3, 8, 9, 11, 14, 18, 19, 21 sowie X und Y) eine inverse Korrelation zwischen den UV-A-induzierten DNS-Schäden und der Dichte aktiver Gene auf den

jeweiligen Chromosomen [Deloukas et al., 1998]. Genärmere Chromosomen (8, X und Y) wiesen nach UV-A-Bestrahlung häufiger Chromosomenbruchstücke im Kometenschweif auf als genreichere (1, 11, 14 und 19). Interessant ist vor allem, dass die von Rapp et al. [2000] bestimmte Bruchempfindlichkeit der Chromosomen 1 und 8 mit den von Bock [1999] veröffentlichten Sensitivitäten des *p58*-Gens (1p36.1) und des *c-myc*-Gens (8q24) tendenziell übereinstimmen. So wiesen bei Rapp et al. 3 % (Chromosom 1) bzw. 25 % (Chromosom 8) der untersuchten humanen Lymphozyten Signale im Schweif auf, während die von Bock [1999] untersuchten Gene in 5 % (*p58*) bzw. 90 % (*c-myc*) der Lymphozyten im Schweif lagen. Im Gegensatz zur UV-A-Strahlung setzen Röntgenstrahlen vor allem in genreichen Chromosomenregionen Schäden [Tucker und Senft, 1994; Slijepcevic, 2004], was für grundsätzlich unterschiedliche Schädigungsmechanismen spricht.

Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene nimmt die Dichte aktiver Gene auf den Chromosomen (ausgedrückt in der Dichte der ESTs „expressed sequence tags“) von Chromosom 5 zu Chromosom 17 hin zu. So ist die ermittelte EST-Dichte für Chromosom 5 (*APC*) geringer als aufgrund der Chromosomengröße erwartet, für Chromosom 12 (*KRAS*) entspricht sie dem erwarteten Wert und für Chromosom 17 (*TP53*) liegt sie signifikant darüber [Deloukas et al., 1998]. Entsprechend nehmen die in dieser Arbeit ermittelten genspezifischen Schäden mit der EST-Dichte der jeweiligen Chromosomen, d.h. vom *APC* zum *TP53* bzw. vom *KRAS* zum *TP53* zu. Der aufgrund unterschiedlicher Gendichte erwartete Sensitivitätsunterschied zwischen *APC* und *KRAS* hingegen wurde nicht beobachtet. Die Korrelation der genspezifischen DNS-Schäden mit der Gendichte der jeweiligen Chromosomen kann, wie erwähnt, mit der Chromosomenstruktur, der Genaktivität oder der lokal spezifischen Aktivität der Reparaturenzyme zusammenhängen. Die H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen bilden auch hier eine Ausnahme, wobei der abweichende Verlauf in den genspezifischen Sensitivitäten sich gegenwärtig nicht erklären lässt.

Aus den Comet-FISH-Versuchen lässt sich das Fazit ziehen, dass sich diese Methode sehr gut eignet, um genspezifische DNS-Schäden in den relevanten Zielgenen der Kolonkarzinogenese zu quantifizieren. Dabei ist die in den Versuchen gefundene Hybridisierungseffizienz mit durchschnittlich $81,9 \pm 3,6$ % gut und hängt nicht von dem jeweils untersuchten Gen ab. Sowohl in primären Kolonzellen als auch in LT97-Zellen sind die durch die genotoxischen Modellsustanzen induzierten DNS-Schäden mit einer verstärkten Auswanderung der genspezifischen Signale in den Kometenschweif assoziiert. Dabei findet sich in den Primärzellen nach Hexenal- bzw. HNE-Schädigung eine gegenüber der Gesamt-DNS signifikant erhöhte Auswanderung der *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Signale in den Kometenschweif. Eine erhöhte Auswanderung der *TP53*-Sonden findet sich in den Primärzellen auch nach Schädigung mit H₂O₂. Hingegen induzieren in den LT97-Zellen nur die Lipidperoxidationsprodukte Hexenal

bzw. HNE genspezifische Schäden, die ausschließlich das *TP53*-Gen betreffen. Insgesamt nehmen die mittels Comet-FISH quantifizierten genspezifischen Schäden in fünf von sechs Versuchsreihen mit der Dichte aktiver Gene auf den jeweiligen Chromosomen zu. Der Vergleich der Gensensitivitäten ergibt in fast allen Versuchsreihen eine erhöhte Empfindlichkeit des *TP53*-Gens und nur in den H₂O₂-behandelten LT97-Zellen erweist sich das *APC*-Gen am sensitivsten. Hinsichtlich der genspezifischen Zellsensitivitäten lässt sich festhalten, dass die Primärzellen empfindlicher auf die Behandlung mit H₂O₂ (*KRAS* und *TP53*) bzw. HNE (*APC* und *KRAS*) reagieren als die LT97-Zellen. In Bezug auf die 2-Farben- und 3-Farben-FISH-Versuche mit *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden muss gesagt werden, dass diese bislang nicht praktikabel sind und weiter optimiert werden müssen.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

6.1 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

1.) Zu der Aufarbeitung von humanen Kolonbiopsien und Kolongewebeproben: Gewinnung und Aufbewahrung von Epithelstreifen, Krypten und Primärzellen

- Humane Kolonbiopsien und humanes Kolongewebe sind eine gute Quelle zur Isolierung von primären Kolonzellen von hervorragender Vitalität und geringer DNS-Basisschadensrate.
- Zwischen der Aufarbeitung von Biopsiematerial und Kolongewebeproben besteht kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Vitalität und DNS-Basisschadensrate.
- Eine auf 120 min verlängerte Verdauzeit ist mit einer signifikant verbesserten Zellvitalität und einer tendenziell verbesserten DNS-Basisschadensrate verbunden.
- Erythrozytenlyse und Dichtegradientenzentrifugation zur Aufreinigung der Zellsuspensionen führten zu signifikant verringerter Zellvitalität (Erythrozytenlyse) bzw. hohen Zellverlusten (Dichtegradientenzentrifugation).
- Die Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen bei 4 °C über Nacht hat keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität oder DNS-Basisschadensrate der isolierten Zellen und schränkt die Eignung dieser Zellen für nachfolgende Versuche nicht ein.
- Kolonkrypten lassen sich sowohl aus dem Biopsiematerial als auch aus den Gewebeproben mit guter struktureller Integrität und Vitalität isolieren, sollten jedoch innerhalb kürzester Zeit in die Testsysteme eingesetzt werden, da bei RT bereits nach 4 h der Zerfall einsetzt.
- Die Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität mit Trypanblau ist bei primären Kolonzellen den tot-vital-Färbungen mit FDA/Trypanblau bzw. FDA/Ethidiumbromid vorzuziehen, da sich die in Primärzellsuspensionen stets vorliegenden Zelltrümmer und Verunreinigungen nach Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch besser erfassen und ausschließen lassen.

2.) Zu den Comet-Assay-Versuchen: Untersuchungen zur Sensitivität der drei verwendeten Zellsysteme (primäre Kolonzellen, LT97-Kolonadenomzellen und HT29clone19a-Kolonadenokarzinomzellen) gegenüber den eingesetzten Modellschadstoffen (Wasserstoffperoxid, trans-2-Hexenal, 4-Hydroxy-2-nonenal)

- H₂O₂, Hexenal und HNE wirken in den untersuchten Zellsystemen dosisabhängig genotoxisch.
- H₂O₂ wirkt in allen Zellen am stärksten genotoxisch, gefolgt von HNE und Hexenal.

- H₂O₂- und Hexenal-induzierte Schäden werden in HT29clone19a- und in primären Kolonzellen innerhalb 120 min fast vollständig repariert.
- HNE-induzierte Schäden unterliegen in HT29clone19a- und in primären Kolonzellen einer langsameren Reparatur.
- Der Reparaturverlauf der HNE-induzierten Schäden korreliert nicht mit der Bildung von Propano-dG-Addukten.
- LT97-Zellen eignen sich nicht für Reparaturversuche und zeigen als vereinzelte Zellen über die 120 minütige Inkubationszeit einen Anstieg der DNS-Basisschadensrate.
- HT29clone19a-Zellen weisen nach Inkubation mit H₂O₂ signifikant höhere DNS-Schäden auf als die primären Kolonzellen, unterscheiden sich jedoch nicht von den LT97-Zellen.
- LT97-Zellen zeigen nach Hexenal- bzw. HNE-Inkubation signifikant höhere DNS-Schäden als HT29clone19a- oder Primärzellen.

3.) Zu den Comet-FISH-Versuchen: Untersuchungen zur spezifischen Sensitivität der für die Kolonkarzinogenese relevanten Gene (*APC*, *KRAS* und *TP53*) gegenüber den eingesetzten Testsubstanzen (Wasserstoffperoxid, trans-2-Hexenal, 4-Hydroxy-2-nonenal)

- HT29clone19a-Zellen können aufgrund ihres hyperdiploiden, von Zelle zu Zelle variierenden Chromosomensatzes nicht für Comet-FISH-Versuche verwendet werden.
- Sowohl in primären Kolonzellen als auch in LT97-Zellen sind mit zunehmender Konzentration der genotoxischen Substanzen mehr Zellen mittelschwer und schwer geschädigt.
- Die Hybridisierungseffizienz mit *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden ist mit durchschnittlich $81,9 \pm 3,6$ % gut. Es wurden keine genspezifischen Unterschiede festgestellt.
- Die mittels genotoxischer Modellsubstanzen induzierten DNS-Schäden sind mit einer verstärkten Auswanderung der genspezifischen Signale in den Kometenschweif assoziiert.
- In Primärzellen tritt nach Hexenal- bzw. HNE-Schädigung eine gegenüber der Gesamt-DNS signifikant erhöhte Auswanderung der *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Signale in den Kometenschweif auf.
- In Primärzellen findet sich nach Behandlung mit H₂O₂ eine gegenüber der Gesamt-DNS signifikant höhere Auswanderung des *TP53*-Gens in den Kometenschweif.
- Eine Behandlung mit Hexenal bzw. HNE führt in LT97-Zellen zu einer gegenüber der Gesamt-DNS verstärkten Auswanderung des *TP53*-Gens in den Kometenschweif.

- Nach H_2O_2 -, Hexenal- oder HNE-Schädigung der Primärzellen wandern die *TP53*-Signale gegenüber den *APC*- bzw. *KRAS*-Signalen vermehrt in den Kometenschweif aus.
- Nach Hexenalschädigung von LT97-Zellen wandern die *TP53*-Signale gegenüber *APC* und *KRAS* vermehrt in den Kometenschweif aus.
- Nach HNE-Schädigung von LT97-Zellen wandern die *TP53*-Signale gegenüber den *APC*-Signalen vermehrt in den Kometenschweif aus.
- In H_2O_2 -geschädigten LT97-Zellen wandern die *APC*-Signale gegenüber den *KRAS* und *TP53* vermehrt in den Kometenschweif aus.
- Primärzellen reagieren hinsichtlich genspezifischer Schäden empfindlicher auf die Behandlung mit H_2O_2 (*KRAS* und *TP53*) bzw. HNE (*APC* und *KRAS*) als LT97-Zellen.
- 2-Farben-FISH- und 3-Farben-FISH-Versuche mit *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden sind bislang nicht praktikabel und müssen weiter optimiert werden.
- Die mittels Comet-FISH quantifizierten genspezifischen Schäden nehmen in fünf von sechs Versuchsreihen mit der Dichte aktiver Gene auf den jeweiligen Chromosomen zu.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass humane Kolongewebeproben eine exzellente Quelle für Primärzellen und Kolonkrypten darstellen. Das erarbeitete Aufarbeitungsprotokoll ermöglicht die Isolierung von Zellen mit hervorragender Vitalität und geringer DNS-Basisschadensrate, die die weitere Verwendung in relevanten Untersuchungssystemen erlaubt. Die systematischen Untersuchungen zur Aufbewahrung von Primärmaterial aus humanem Kolongewebe belegen, dass eine 16-20-stündige Aufbewahrung von unverdaulichem Kolonepithel bei 4 °C ohne negative Auswirkung auf die anschließend aus dem Gewebe isolierten Zellen und Krypten bleibt. Damit ist für die Arbeiten mit humanen Kolonproben eine Möglichkeit zur flexibleren Versuchsgestaltung gegeben.

Die im Comet-Assay erarbeiteten Ergebnisse zeigen, dass H_2O_2 als Modellsubstanz für oxidativen Stress und Hexenal bzw. HNE als reaktive Lipidperoxydationsprodukte dosisabhängige DNS-Schäden in humanen Kolonzellen induzieren. Die erstmals durchgeführte vergleichende Untersuchung zur genotoxischen Wirkung der Testsubstanzen in den verwendeten Zellmodellen der Kolonkarzinogenese zeigt, dass Zellen, die unterschiedliche Stadien der humanen Tumorentstehung widerspiegeln, unterschiedlich sensitiv auf genotoxische Agenzien reagieren. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit verschiedene Zellstadien in die Untersuchungen zur molekularen Kolonkarzinogenese einzubeziehen. Nur so lassen sich relevante Informationen über den gesamten Prozess der Tumorgenese erhalten.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit und ein wichtiges Novum war die Untersuchung von H_2O_2 -, Hexenal- und HNE-induzierten genspezifischen Schäden in den relevanten Genen der humanen

Kolonkarzinogenese mittels Comet-FISH. Diese Methode bietet die hervorragende Möglichkeit, die Wirkung genotoxischer Substanzen auch auf genspezifischer Ebene zu quantifizieren und dadurch ihr Risikopotential besser zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Comet-FISH-Methode erstmals zu breit angelegten vergleichenden Untersuchungen in humanen Kolonzellen genutzt. Die Comet-FISH-Ergebnisse zeigen, dass vor allem Lipidperoxidaionsprodukte über die global genotoxische Wirkung hinaus genspezifische Schäden in den für die kolorektale Karzinogenese relevanten Genen setzen, wobei primär das *TP53*-Gen getroffen wird. Am empfindlichsten in Hinblick auf genspezifische Schäden sind dabei unveränderte, primäre Kolonzellen, während sich LT97- und HT29clone19a-Zellen sensitiver bei der Schädigung der Gesamt-DNS zeigen. Insgesamt stellt die Comet-FISH-Technik eine wichtige neue Methode dar, um Risikofaktoren der humanen Kolonkarzinogenese zu erfassen und eingehender zu charakterisieren. Genspezifische Schäden in den für die Kolonkarzinogenese relevanten Genen lassen auch Mutationen in eben diesen Genen wahrscheinlicher werden. Wenn die hier betrachteten genotoxischen Substanzen über ihre genspezifische Reaktivität hinaus hinsichtlich ihres Mutationsspektrums untersucht würden, sollten sich diese Informationen mit epidemiologischen Daten zu individuellem Lebensstil und Ernährung sowie mit molekularen Daten zu individueller genetischer Prädisposition zu einem Gesamtbild fügen.

6.2 Ausblick

Arbeiten mit Kolongewebeproben

Die aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern wesentliche Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. So wäre bei den Arbeiten mit Kolongewebeproben hinsichtlich der Primärzellaufarbeitung eine Aufreinigung der Zellsuspension wünschenswert. Die Abtrennung von HT29clone19a-Zellen durch magnetische Separation mittels DynaBeads® verläuft erfolgreich und sollte sich auch für die Abtrennung primärer Kolonepithelzellen nutzen lassen. Hierfür wären Versuchsreihen mit unterschiedlichen epithelialen Antikörpern notwendig, um schließlich diejenigen zu finden, die an frisch isolierte Kolonepithelzellen binden und somit eine Abtrennung erlauben. Interessant wäre auch die Verwendung der so aufgereinigten Zellen für Primärzellkulturen, die einen weiteren Schritt zur flexiblen Nutzung der isolierten Primärzellen darstellen würde. Solange jedoch keine Primärzellkultur am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie etabliert ist, stellen die direkte Aufarbeitung der Kolongewebeproben sowie die kurzfristige Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen die besten Alternativen dar. Sind Vitalität und DNS-Basisschadensrate die entscheidenden Bewertungsparameter, so kommt gegenwärtig nur eine kurzfristige Aufbewahrung der Kolonepithelstreifen in Frage. Sind Fragestellung und Testsystem jedoch

andere, so ist auch die Aufarbeitung kryokonservierter Epithelstreifen interessant, so z. B. bei der Bestimmung von Enzymkonzentrationen, Enzymaktivitäten oder Genpolymorphismen.

Ausgehend von der Isolierung und Charakterisierung der Kolonkrypten ist es nun möglich, diese in relevante Versuchssysteme einzusetzen. So ist die Arbeit mit intakten Krypten für Fragestellungen der Kolonkarzinogenese besonders wichtig, da die Stammzellen des unteren Kryptbereichs die eigentlichen Zielzellen darstellen, aus denen sich bei monoklonaler Expansion die Kolontumore entwickeln. Eine Auftrennung der Kryptzellen nach unterem und oberem Kryptbereich würde es zulassen, die relative Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber DNS-schädigenden Noxen zu untersuchen. Eine Möglichkeit, die Zellen des oberen und unteren Kryptbereichs differenziert zu betrachten, besteht im Comet-Assay mit intakten Krypten. Aus der relativen Wanderung der DNS bzw. der unterschiedlichen Wanderung spezifischer Gene (Comet-Assay bzw. Comet-FISH) sollten sich schließlich Informationen über die relative Sensitivität des oberen und unteren Kryptbereichs ergeben. Zur Auswertung des Comet-Assays mit intakten Krypten ist es notwendig, dass die Krypten bei der Elektrophorese senkrecht zum elektrischen Feld liegen. Ihre Fixierung auf den Objektträgern ist bisher jedoch zufällig und die Quantifizierung der Schäden schwierig. Als vielversprechende, alternative Möglichkeiten stellen sich Laser Catapulting Microdissection und Mikrodissektion mittels Eppendorff-Mikromanipulator dar. Mit diesen Methoden sollten sich auch vitale Zellen oder Zellcluster aus frischen Gewebeproben gewinnen und für die molekulare Analyse bereitstellen lassen. Mittels Mikrodissektion könnten reine Zellpopulationen des oberen und unteren Kryptbereichs isoliert und getrennt in die Versuchssysteme eingesetzt werden. Comet-Assay- und Comet-FISH-Versuche könnten dann mit Einzellzellsuspensionen von teilungsaktiven bzw. ausdifferenzierten Kolonepithelzellen durchgeführt werden. Weitere denkbare Versuchssysteme für diese Zellen wären PCR bzw. RT-PCR, die auf DNS- bzw. RNS-Ebene Informationen zum oberen und unteren Kryptbereich liefern könnten.

Comet-Assay

Hinsichtlich der Comet-Assay-Ergebnisse wäre es interessant, weitere ernährungsrelevante Substanzen auf ihr genotoxisches Potential zu testen. Das Arbeiten mit Zellsystemen, die unterschiedliche Stadien der kolorektalen Karzinogenese darstellen, liefert Aussagen zu den spezifischen Empfindlichkeiten dieser Zellstadien. Um die Untersuchungen zur Reparaturkapazität während der verschiedenen Tumorstadien abzuschließen, müssten die begonnenen Reparaturversuche mit LT97-Zellen zu Ende geführt werden. Dabei bestünde vor allem die Notwendigkeit, über die 120 minütige Inkubationsdauer eine gute Zellvitalität und geringe DNS-Basisschadensrate zu erhalten. Die Verwendung von Zellclustern, die über die Reparaturzeit weiter zerfallen, könnte eventuell eine Lösung darstellen. Perspektivisch wäre auch eine Quantifizierung der ROS-Konzentration in H₂O₂-inkubierten Zellen bzw. eine

Bestimmung der intrazellulären Hexenal- und HNE-Konzentration nach Substanzbehandlung erforderlich. Die in den Zellen vorliegenden Substratmengen könnten als Wirkkonzentrationen angesehen werden und würden ein ganz neues Licht auf die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Zusammenhänge werfen. Damit verbunden wäre auch eine weitergehende Quantifizierung der nach Hexenal- bzw. HNE-Inkubation in den Zellen vorliegenden exozyklischen Etheno- und Propano-DNS-Addukte interessant. Die analytische Bestimmung dieser Addukte würde zudem ein weiteres Puzzleteil zwischen ernährungsbedingten Risikofaktoren und DNS-Schäden als prämutagene Läsionen darstellen.

Comet-FISH

Im Anschluss an die Comet-FISH-Versuche unter Verwendung von *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Sonden könnte eine Mutationsanalyse in den H₂O₂-, Hexenal- bzw. HNE-behandelten Zellen interessante Ergebnisse liefern. Diese würden vor allem dem Beweis dienen, dass sich die im Comet-FISH nachgewiesenen genspezifischen Schäden auch auf Mutationsebene manifestieren. Hinsichtlich der Comet-FISH-Versuche wäre es weiterhin interessant, die genspezifische Sensitivität des *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gens gegenüber anderen ernährungsrelevanten Risikofaktoren zu testen. Auch die Hinzunahme weiterer in die humane Kolonkarzinogenese involvierter Gene wäre bedeutsam. Hier könnten z. B. Sonden für das *MCC*-Gen oder für 18q (*DCC* bzw. *SMAD2/4*) in die Untersuchungen aufgenommen werden. Ein anderes Ziel stellen weitere FISH-Versuche mit Ganzchromosomenproben dar, um den Zusammenhang zwischen genspezifischen Schäden und der Dichte aktiver Gene auf chromosomaler Ebene zu bestätigen. Dazu müsste ein Auswertungsprotokoll erstellt werden, das eine unabhängige fluoreszenzmikroskopische Auswertung ermöglicht und von Zelle zu Zelle keine Unterschiede in der Intensität bzw. Größe des jeweiligen Chromosomensignals mit sich bringt. In Anbetracht einer Vielzahl interessanter Substanzen und in Betracht kommender Gene wäre langfristig eine teilweise Automatisierung der Comet-FISH-Auswertung erstrebenswert, da die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Objektträger den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Versuchsdurchführung darstellt.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: In Deutschland stellen Tumorerkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar und verursachen etwa ein Viertel der jährlichen Todesfälle. Dabei ist der Kolorektalkrebs mit insgesamt 25.000 Todesfällen pro Jahr sowohl für Frauen als auch für Männer die zweithäufigste Krebstodesursache. Neben der genetischen Prädisposition sind es Faktoren des individuellen Lebensstils, die ursächlich mit der Kolonkarzinogenese verbunden sind. Hier ist vor allem die Ernährung zu nennen, die als individueller Risikofaktor mit etwa 35 % zur kolorektalen Tumorentstehung beiträgt. Der World Cancer Research Fund geht inzwischen davon aus, dass bei Dickdarmtumoren etwa 66-75 % der Todesfälle durch Ernährungsumstellung vermieden werden könnten. Auf molekularer und genetischer Ebene stellt sich der Zusammenhang so dar, dass karzinogen wirkende Substanzen, die entweder exogen mit der Nahrung aufgenommen oder aber endogen aufgrund einer bestimmten Ernährung gebildet werden, DNS-Schäden und Mutationen in den für die kolorektale Karzinogenese relevanten Genen setzen. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang ernährungsbedingter oxidativer Stress, durch den vermehrt reaktive Sauerstoffspezies und, als Folge induzierter Lipidperoxidation, auch reaktive Alkenale freigesetzt werden.

Zielstellung: Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung ernährungsbedingter Risikofaktoren in den unterschiedlichen Stadien der humanen Kolonkarzinogenese hinsichtlich ihres Potentials, globale und genspezifische DNS-Schäden zu setzen, zu untersuchen. Dazu sollte (1.) die Aufarbeitung humaner Kolonbiopsien und Kolongewebeproben zur Gewinnung von Krypten und Primärzellen am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie etabliert werden. Zudem galt es Möglichkeiten zur Aufreinigung der Primärzellsuspensionen sowie zur Aufbewahrung des Gewebematerials zu testen und miteinander zu vergleichen, wobei sowohl die Aufarbeitungsschritte als auch Aufreinigung und Aufbewahrung hinsichtlich Zellvitalität und DNS-Basissschadensrate zu optimieren waren. Darüber hinaus sollte (2.) die Sensitivität primärer Kolonzellen, LT97- und HT29clone19a-Zellen gegenüber ernährungsbedingten, endogenen Risikofaktoren untersucht werden. Durch Gegenüberstellung der Ergebnisse sollten die genotoxische Wirkung der Modellschadstoffe in den verschiedenen Zellsystemen beurteilt und Aussagen zu der spezifischen Sensitivität und Reparaturkapazität der unterschiedlichen Zellen getroffen werden. Abschließend war (3.) die Comet-FISH-Methode am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie zu etablieren, um die spezifische Sensitivität der für die Kolonkarzinogenese relevanten Gene (*APC*, *KRAS* und *TP53*) gegenüber den untersuchten Modellschadstoffen zu quantifizieren sowie die untersuchten Gene und die verwendeten Zellen hinsichtlich ihrer genspezifischen Sensitivität zu vergleichen.

Material und Methoden: Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde mit primären Kolonzellen, LT97- und HT29clone19a-Zellen, die jeweils ein anderes Stadium der kolorektalen

Karzinogenese darstellen, gearbeitet. Zur Gewinnung des Primärmaterials wurden 18 Kolonbiopsie- und 71 Kolongewebeproben durch Proteinase/Collagenase-Verdau aufgearbeitet. Aufarbeitung, Aufreinigung und Aufbewahrung des humanen Kolongewebes wurden mit Blick auf Vitalität und DNS-Basisschadensrate der Zellen optimiert. Als Modellsubstanzen für ernährungsbedingte Risikofaktoren dienten H_2O_2 (oxidativer Stress), sowie Hexenal und HNE (reaktive Lipidperoxidaionsprodukte). Die Zellen wurden mit H_2O_2 für 5 min bei 4 °C inkubiert oder mit Hexenal bzw. HNE für 30 min bei 37 °C behandelt und die durch die Testsubstanzen induzierten Gesamt-DNS-Schäden mittels Einzelzellgelelektrophorese (Comet-Assay) quantifiziert. Die Reparatur der induzierten Schäden wurde durch Inkubation bei 37 °C über 120 min verfolgt. Genspezifische Schäden in den für die kolorektale Karzinogenese relevanten Genen wurden mittels Comet-FISH, einer Kombination aus Comet-Assay und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, analysiert. Für diese Untersuchungen und auch für die 2-Farben- bzw. 3-Farben-FISH-Versuche kamen direkt oder indirekt markierte Sonden für das *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gen zur Anwendung. Die Fluoreszenzsignale wurden hinsichtlich Anzahl und Lage innerhalb der Zellen sowie hinsichtlich möglicher Brüche ausgewertet.

Ergebnisse: (1.) Die Aufarbeitung von humanen Kolonbiopsien und humanem Kolongewebe ermöglichte die Isolierung von primären Kolonzellen von hervorragender Vitalität und geringer DNS-Basisschadensrate, wobei sich eine auf 120 min verlängerte Verdauzeit signifikant positiv auf die Zellvitalität auswirkte. Hinsichtlich Vitalität und Basisschadensrate der isolierten Primärzellen wurde kein Unterschied zwischen Biopsiematerial und Gewebeproben gefunden. Die zur weiteren Aufreinigung der Primärzellsuspensionen verwendeten Methoden hatten negative Effekte auf die Zellvitalität (Erythrozytenlyse) bzw. Zellzahl (Dichtegradientenzentrifugation) oder waren generell erfolglos (magnetische Zellseparation mittels DynaBeads®). Die zur kurzfristigen und langfristigen Aufbewahrung von Primärmaterial (Zellen, Krypten, Epithelstreifen) durchgeführten Versuchsreihen ergaben, dass nur eine kurzfristige Aufbewahrung von Kolonepithelstreifen bei 4 °C über Nacht eine gute Zellvitalität und geringe DNS-Basisschadensrate gewährleistet. Die aus den Kolonbiopsien bzw. aus dem Kolongewebe mit hoher Vitalität isolierten Krypten zerfielen bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden, wobei Apoptose, Zelltod und Zerfall vom oberen zum unteren Kryptbereich hin fortschritten.

(2.) Vergleichende Untersuchungen zur DNS-schädigenden Wirkung von H_2O_2 , Hexenal und HNE in den humanen Kolonzellen ergaben, dass die Testsubstanzen in allen untersuchten Kolonzellen konzentrationsabhängige DNS-Schäden induzierten. H_2O_2 wirkte in allen Zellen am stärksten genotoxisch, gefolgt von HNE und Hexenal. Nach Inkubation mit H_2O_2 zeigten die HT29clone19a- signifikant höhere DNS-Schäden als die primären Kolonzellen. Nach Hexenal- und HNE-Inkubation wiesen hingegen die LT97-Zellen signifikant höhere DNS-Schäden auf als die HT29clone19a- und die Primärzellen. Bei den durchgeführten Reparaturversuchen erwies

sich, dass in den HT29clone19a-Zellen und in den primären Kolonzellen die H_2O_2 - und auch die Hexenal-induzierten Schäden nach 120 min zum größten Teil repariert waren. Die Reparaturkapazität der HT29clone19a- und der Primärzellen war dabei vergleichbar gut. Die HNE-induzierten Schäden wurden nach anfänglichem Anstieg ebenfalls repariert, wobei dieser ungewöhnliche Reparaturverlauf nicht mit der Bildung von Propano-dG-Addukten korrelierte. Einzelzellsuspensionen der LT97-Zellen eigneten sich nicht für Reparaturversuche, da die DNS-Basisschäden über die Reparaturzeit auf TI-Werte $> 10\%$ anstiegen.

(3.) Die breit angelegten Comet-FISH-Untersuchungen ermöglichten erstmals, die genspezifischen Empfindlichkeiten des *APC*-, *KRAS*- und *TP53*-Gens gegenüber den verwendeten Testsubstanzen zu bestimmen. Für die praktischen Arbeiten wurden primäre Kolonzellen und LT97-Kolonadenomzellen verwendet, da sich die HT29clone19a-Zellen aufgrund des von Kooperationspartnern bestimmten Karyotyps als ungeeignet erwiesen. Der Vergleich der induzierten genspezifischen DNS-Schäden mit den globalen, im Comet-Assay quantifizierten ergab für die Hälfte der Versuchsreihen signifikant höhere genspezifische Schäden. Diese betrafen in Hexenal- und HNE-geschädigten Primärzellen alle drei Gene, in Hexenal- und HNE-behandelten LT97-Zellen nur das *TP53*-Gen. *TP53* wies in Primärzellen auch nach H_2O_2 -Schädigung hoch signifikante genspezifische Schäden auf. Eine Gegenüberstellung der Gene zeigte, dass *TP53* signifikant empfindlicher reagierte als *APC* und *KRAS*, die eine vergleichbare Sensitivität aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten hier die H_2O_2 -geschädigten LT97-Zellen, in denen das *APC*-Gen die höchste Sensitivität aufwies. Im Vergleich zu den LT97-Adenomzellen zeigten die primären Kolonzellen nach Schädigung mit HNE (*APC* und *KRAS*) bzw. nach Schädigung mit H_2O_2 (*KRAS* und *TP53*) eine signifikant erhöhte Empfindlichkeit gegenüber genspezifischen Schäden.

Schlussfolgerungen: Die Isolierung von Primärzellen aus humanem Kolongewebe erlaubt die Gewinnung hinreichender Zellmengen, welche detaillierte Untersuchungen zur Wirkung endogen gebildeter Noxen zulassen. Hinsichtlich der humanen Kolonkarzinogenese ist allerdings die Verwendung verschiedener Zellmodelle wünschenswert, um das Risikopotential von Substanzen in den verschiedenen Stadien der Tumorgenese richtig einschätzen zu können. So könnte die im Rahmen dieser Arbeit gefundene höhere Empfindlichkeit der LT97-Adenomzellen gegenüber Hexenal- bzw. HNE-induzierten Schäden an der Gesamt-DNS z. B. darauf schließen lassen, dass Menschen mit Kolonadenomen ein erhöhtes Risiko gegenüber Ernährungsfaktoren besitzen, die zu Lipidperoxidation führen. Die Comet-FISH-Methode bietet die einzigartige Möglichkeit ernährungsbedingte Risikofaktoren auch in Hinblick auf ihre genspezifische Reaktivität in krebsrelevanten Genen zu untersuchen und ermöglicht somit eine adäquate Einschätzung dieser Faktoren.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Rahman WM, Katsura K, Rens W, Gorman PA, Sheer D, Bicknell D, Bodmer WF, Arends MJ, Wyllie AH, Edwards PA. (2001) Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2538-43.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. (1999) Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis*, **20**, 629-34.
- Alberts B (Editor). Molecular Biology of the cell. 3rd Ed., Garland Publishing NY 1994.
- Ames, BN, Gold LS. (1998) The Prevention of Cancer. *Drug Metab Rev*, **30**, 203-225.
- Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J et al. (2001) Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*, **85**, 692-6.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland. 3. Aufl., Saarbrücken 2002.
- Arends JW. (2000) Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *J Pathol*, **190**, 412-6.
- Augeron C, Laboisie CL. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res*, **44**, 61-9.
- Bach SP, Renahan AG, Potten CS. (2000) Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis*, **21**, 469-76.
- Banerjee D, Madhusoodanan UK, Nayak S, Jacob J. (2003) Urinary hydrogen peroxide: a probable marker of oxidative stress in malignancy. *Clin Chim Acta*, **334**, 205-9.
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B. (1990) TP53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res*, **50**, 7717-22.
- Barbin A. (2000) Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra. *Mutat Res*, **462**, 55-69.
- Bartsch H, Barbin A, Marion MJ, Nair J, Guichard Y. (1994) Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA. *Drug Metab Rev*, **26**, 349-71.
- Bartsch H, Nair J, Owen RW. (2002) Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biol Chem*, **383**, 915-21.
- Basu AK, Loechler EL, Leadon SA, Essigmann JM. (1989) Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7677-81.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M. (1998) Development and validation of the in vivo alkaline Comet-Assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res*, **415**, 167-84.
- Benya RV, Schmidt LN, Sahi J, Layden TJ, Rao MC. (1991) Isolation, characterization, and attachment of rabbit distal colon epithelial cells. *Gastroenterology*, **101**, 692-702.
- Berlau J, Gleis M, Pool-Zobel BL. (2004) Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal Bioanal Chem*, **378**, 737-43.
- Berwick M, Vineis P. (2000) Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer*, **92**, 874-97.
- Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Key TJ, Trichopoulou A, Naska A, Vineis P, Tumino R, Krogh V, Bueno-de-

- Mesquita HB, Peeters PH, Berglund G, Hallmans G, Lund E, Skeie G, Kaaks R, Riboli E. (2003) European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, **361**, 1496-501.
- Bock C, Monajembashi S, Rapp A, Dittmar H, Greulich KO. (1999) Localisation of specific sequences and DNA single strand breaks in individual UV-A irradiated human lymphocytes observed by Comet-FISH. *Proc SPIE*, **3568**, 207-217.
- Bock C. Charakterisierung von DNS-Brüchen im Genom mit Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet assay) und von regiospezifischen Schäden mit Comet-FISH. Universität Jena, Diss. 1999.
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al. (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, **328**, 614-6.
- Bonithon-Kopp C, Benhamiche AM. (1999) Are there several colorectal cancers? Epidemiological data. *Eur J Cancer Prev*, **1**, S3-12.
- Booth C, Patel S, Bennion GR, Potten CS. (1995) The isolation and culture of adult mouse colonic epithelium. *Epithelial Cell Biol*, **4**, 76-86.
- Booth C, O'Shea JA, Potten CS. (1999) Maintenance of functional stem cells in isolated and cultured adult intestinal epithelium. *Exp Cell Res*, **249**, 359-66.
- Bos JL. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, **49**, 4682-9.
- Boutron-Ruault MC, Senesse P, Meance S, Belghiti C, Faivre J. (2001) Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer*, **39**, 50-7.
- Brooks RA, Winton DJ. (1996) Determination of spatial patterns of DNA damage and repair in intestinal crypts by multi-cell gel electrophoresis. *J Cell Sci*, **109**, 2061-8.
- Bruce WR, Giacca A, Medline A. (2000) Possible mechanisms relating diet and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 1271-9.
- Burcham PC. (1999) Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat Res*, **443**, 11-36.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res*, **424**, 9-21.
- Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. (2003) Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia*, **17**, 1263-93.
- Chaung W, Boorstein RJ. (1997) Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells. *Mutat Res*, **373**, 125-37.
- Chen HJ, Chung FL. (1996) Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol*, **9**, 306-12.
- Chung FL, Chen HJ, Nath RG. (1996) Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, **17**, 2105-11.
- Chung FL, Pan J, Choudhury S, Roy R, Hu W, Tang MS. (2003) Formation of trans-4-hydroxy-2-nonenal- and other enal-derived cyclic DNA adducts from omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and their roles in DNA repair and human p53 gene mutation. *Mutat Res*, **531**, 25-36.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*, **104**, S465-9.
- Collins AR, Duthie SJ, Fillion L, Gedik CM, Vaughan N, Wood SG. (1997) Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem Soc Trans*, **25**, 326-31.

- Collins AR, Horvathova E. (2001) Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans*, **29**, 337-41.
- Collins AR. (2002) The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol*, **203**, 163-77.
- Collins AR, Harrington V. (2002) Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis*, **17**, 489-93.
- Collins AR, Harrington V, Drew J, Melvin R. (2003) Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis*, **24**, 511-5.
- Collins AR. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, **26**, 249-61.
- Cremer C, Munkel C, Granzow M, Jauch A, Dietzel S, Eils R, Guan XY, Meltzer PS, Trent JM, Langowski J, Cremer T. (1996) Nuclear architecture and the induction of chromosomal aberrations. *Mutat Res*, **366**, 97-116.
- Darmon E, Cleary KR, Wargovich MJ. (1994) Immunohistochemical analysis of *TP53* overexpression in human colonic tumors. *Cancer Detect Prev*, **18**, 187-95.
- Deloukas P, Schuler GD, Gyapay G, Beasley EM, Soderlund C, Rodriguez-Tome P, Hui L, Matisse TC, McKusick KB, Beckmann JS, Bentolila S, Bihoreau M, Birren BB, Browne J, Butler A, Castle AB, Chiannilkulchai N, Clee C, Day PJ, Dehejia A, Dibling T, Drouot N, Duprat S, Fizames C, Bentley DR, et al. (1998) A physical map of 30,000 human genes. *Science*, **282**, 744-6.
- Diculescu GL. (1997) The sources of variation in the human genome and genome instability in human cancers. *Rom J Physiol*, **34**, 3-17.
- Doll R, Peto R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, **66**, 1191-308.
- D'Odorico A, Bortolan S, Cardin R, D'Inca R, Martines D, Ferronato A, Sturniolo GC. (2001) Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, **36**, 1289-94.
- Duff EK, Clarke AR. (1998) Smad4 (DPC4)--a potent tumour suppressor? *Br J Cancer*, **78**, 1615-9.
- Duthie SJ, Collins AR. (1997) The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Radic Biol Med*, **22**, 717-24.
- Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL. (1997) The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells. *Mutat Res.*, **390**, 141-51.
- Duthie SJ, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. (2000) Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. *Nutr Cancer*, **37**, 245-51.
- Dzierzewicz Z, Orchel A, Swierczek-Zieba G, Latocha M, Cwalina B, Wilczok T. (2000) Normal colonocytes in primary culture--an experimental model for molecular pharmacology and biology of large intestine. *Acta Pol Pharm*, **57**, S23-5.
- Ebert MN, Beyer-Sehlmeyer G, Liegibel UM, Kautenburger T, Becker TW, Pool-Zobel BL. (2001) Butyrate induces glutathione S-transferase in human colon cells and protects from genetic damage by 4-hydroxy-2-nonenal. *Nutr Cancer*, **41**, 156-64.
- Eckl PM, Ortner A, Esterbauer H. (1993) Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat Res*, **290**, 183-92.
- Eder E, Deininger C. (2000) The role of alcohols as solvents in the genotoxicity testing of alpha,beta-unsaturated ketones in the SOS chromotest. *Mutat Res*, **470**, 29-37.
- Eder E, Deininger C. (2002) The influence of the solvents DMSO and ethanol on the genotoxicity of alpha,beta-unsaturated aldehydes in the SOS chromotest. *Mutat Res*, **516**, 81-9.

- Eder E, Schuler D, Budiawan B. (1999) Cancer risk assessment for crotonaldehyde and 2-hexenal: an approach. *IARC Sci Publ*, **150**, 219-32.
- Eder E, Schuler D. (2000) An approach to cancer risk assessment for the food constituent 2-hexenal on the basis of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of 2-hexenal in vivo. *Arch Toxicol*, **74**, 642-8.
- Esterbauer H. Aldehydic products of lipid peroxidation in Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer. McBrien DCH, Slater TF (Editors), Academic Press London 1982.
- Esterbauer H, Eckl P, Ortner A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat Res*, **238**, 223-33.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **11**, 81-128.
- Everett SM, White KL, Schorah CJ, Calvert RJ, Skinner C, Miller D, Axon AT. (2000) In vivo DNA damage in gastric epithelial cells. *Mutat Res*, **468**, 73-85.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, **339**, 37-59.
- Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990) Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, **247**, 49-56.
- Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-67.
- Fearon ER. (1994) Molecular genetic studies of the adenoma-carcinoma sequence. *Adv Intern Med*, **39**, 123-47.
- Feng Z, Hu W, Amin S, Tang MS. (2003) Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and -deficient human cells. *Biochemistry*, **42**, 7848-54.
- Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Rivero MT, Genesca A, Gosalvez J, Goyanes V. (2001) DBD-fish on neutral comets: simultaneous analysis of DNA single- and double-strand breaks in individual cells. *Exp Cell Res*, **270**, 102-9.
- Fogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In Human Tumor Cells in Vitro. Fogh J (Editor), Plenum Press New York 1975.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst*, **58**, 209-14.
- Fodde R, Smits R, Clevers H. (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 55-67.
- Follmann W, Weber S, Birkner S. (2000) Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes. *Toxicol In Vitro*, **14**, 435-45.
- Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, Dogliotti E. (1996) Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*, **11**, 169-75.
- Fujimori T, Kawamata H, Kashida H. (2001) Precancerous lesions of the colorectum. *J Gastroenterol*, **36**, 587-94.
- Gackowski D, Ciecierski M, Jawien A, Olinski R. (2001) Background level of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in lymphocyte DNA does not correlate with the concentration of antioxidant vitamins in blood plasma. *Acta Biochim Pol*, **48**, 535-9.
- Gackowski D, Banaszkievicz Z, Rozalski R, Jawien A, Olinski R. (2002) Persistent oxidative stress in colorectal carcinoma patients. *Int J Cancer*, **101**, 395-7.
- Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schrock E, Neumann T, Jauho A, Auer G, Ried T. (2000) Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*, **27**, 183-90.
- Gibson PR, van de Pol E, Maxwell LE, Gabriel A, Doe WF. (1989) Isolation of colonic crypts that maintain structural and metabolic viability in vitro. *Gastroenterology*, **96**, 283-91.

- Giovannelli L, Testa G, De Filippo C, Cheynier V, Clifford MN, Dolara P. (2000) Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. *Eur J Nutr*, **39**, 207-12.
- Glaab V, Collins AR, Eisenbrand G, Janzowski C. (2001) DNA-damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexene-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals. *Mutat Res*, **497**, 185-97.
- Glei M, Latunde-Dada GO, Klinder A, Becker TW, Hermann U, Voigt K, Pool-Zobel BL. (2002) Iron-overload induces oxidative DNA damage in the human colon carcinoma cell line HT29 clone 19A. *Mutat Res*, **519**, 151-61.
- GLOBOCAN 2000. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC Press Lyon 2001.
- Golzer P, Janzowski C, Pool-Zobel BL, Eisenbrand G. (1996) (E)-2-hexenal-induced DNA damage and formation of cyclic 1,N2-(1,3-propano)-2'-deoxyguanosine adducts in mammalian cells. *Chem Res Toxicol*, **9**, 1207-13.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, **66**, 589-600.
- Gros L, Ishchenko AA, Saporbaev M. (2003) Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat Res*, **531**, 219-29.
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21. 1. *Science*, **271**, 350-3.
- Halliwell B. (2002) Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med*, **32**, 968-74.
- Harma M, Harma M, Erel O. (2003) Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly*, **133**, 563-6.
- Harreus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Kleinsasser NH. (2002) The single cell microgelelectrophoresis technique in ecogenotoxicology. *Laryngorhinootologie*, **81**, 528-33.
- Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 288-93.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. (1999) 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*, **300**, 156-66.
- Hennig W (Hrsg.). Genetik 3. Aufl., Springer Verlag Berlin 2002.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, **390**, 465-71.
- Hu ML, Chuang CH, Sio HM, Yeh SL. (2002a) Simple cryoprotection and cell dissociation techniques for application of the Comet-Assay to fresh and frozen rat tissues. *Free Radic Res*, **36**, 203-9.
- Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S, Chung FL, Tang MS. (2002b) The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, **23**, 1781-9.
- Hussain SP, Harris CC. (1998) Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*, **58**, 4023-37.
- Hussain SP, Raja K, Amstad PA, Sawyer M, Trudel LJ, Wogan GN, Hofseth LJ, Shields PG, Billiar TR, Trautwein C, Hohler T, Galle PR, Phillips DH, Markin R, Marrogi AJ, Harris CC. (2000a) Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12770-5.

- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC. (2000b) Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res*, **60**, 3333-7.
- Huycke MM, Abrams V, Moore DR. (2002) Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*, **23**, 529-36.
- Ide M, Weiler D, Kita H, Gleich GJ. (1994) Ammonium chloride exposure inhibits cytokine-mediated eosinophil survival. *J Immunol Methods*, **168**, 187-96.
- Irshad M, Chaudhuri PS. (2002) Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*, **40**, 1233-9.
- Jacob RA, Burri BJ. (1996) Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr*, **63**, S985-990.
- Jagielski M, Zaleska M, Kaluzewski S, Polna I. (1976) Applicability of DAPI for the detection of Mycoplasmas in cell cultures. *Med Dosw Mikrobiol*, **28**, 161-73.
- Janzowski C, Glaab V, Samimi E, Schlatter J, Eisenbrand G. (2000) 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food Chem Toxicol*, **38**, 801-9.
- Janzowski C, Glaab V, Mueller C, Straesser U, Kamp HG, Eisenbrand G. (2003) alpha,beta-Unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mutagenesis*, **18**, 465-70.
- Jass JR, Young J, Leggett BA. (2002) Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**, 17-26.
- Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. (1994) Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res*, **54**, 5523-6.
- Jenkins GJ, Morgan C, Baxter JN, Parry EM, Parry JM. (2001) The detection of mutations induced in vitro in the human p53 gene by hydrogen peroxide with the restriction site mutation (RSM) assay. *Mutat Res*, **498**, 135-44.
- Jiricny J, Marra G. (2003) DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 61-9.
- Johnson KL, Brenner DJ, Nath J, Tucker JD, Geard CR. (1999) Radiation-induced breakpoint misrejoining in human chromosomes: random or non-random? *Int J Radiat Biol*, **75**, 131-41.
- Joossens JV, Kesteloot H. (2001) Epidemiology of cancer mortality. *Verh K Acad Geneesk Belg*, **63**, 123-35.
- Kaklamanis L, Gatter KC, Mortensen N, Baigrie RJ, Heryet A, Lane DP, Harris AL. (1993) TP53 expression in colorectal adenomas. *Am J Pathol*, **142**, 87-93.
- Karam SM. (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci*, **15**, 286-98.
- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. (2000) Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res*, **463**, 13-31.
- Kawai K, Viars C, Arden K, Tarin D, Urquidi V, Goodison S. (2002) Comprehensive karyotyping of the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 1-8.
- Kim KM, Shibata D. (2002) Methylation reveals a niche: stem cell succession in human colon crypts. *Oncogene*, **21**, 5441-9.
- Kim YI, Mason JB. (1996) Nutrition chemoprevention of gastrointestinal cancers: a critical review. *Nutr Rev*, **54**, 259-79.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-70.
- Kiokias S, Gordon MH. (2003) Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *Eur J Clin Nutr*, **57**, 1135-40.

- Kleeberger W, Rothamel T, Glockner S, Lehmann U, Kreipe H. (2000) Laser-assisted microdissection and short tandem repeat PCR for the investigation of graft chimerism after solid organ transplantation. *Pathobiology*, **68**, 196-201.
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Zieger S, Baluschko T, Wallner BC, Harreus UA. (2003) Preservation of mucosal specimens before processing in the alkaline single cell microgel electrophoresis assay. *HNO*, **51**, 134-9.
- Ko LJ, Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-72.
- Kolligs FT, Bommer G, Goke B. (2002) Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, **66**, 131-44.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415-20.
- Kreutzer DA, Essigmann JM. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3578-82.
- Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol*, **201**, 28-36.
- Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. (2003) Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer*, **36**, 207-10.
- Lane DP. (1992) Cancer. TP53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-6.
- La Vecchia C, Franceschi S, Levi F. (2003) Epidemiological research on cancer with a focus on Europe. *Eur J Cancer Prev*, **12**, 5-14.
- Lechner S, Muller-Ladner U, Renke B, Scholmerich J, Ruschoff J, Kullmann F. (2003) Gene expression pattern of laser microdissected colonic crypts of adenomas with low grade dysplasia. *Gut*, **52**, 1148-53.
- Leinung S, Wurl P, Weiss CL, Roder I, Schonfelder M. (2000) Cytokeratin-positive cells in bone marrow in comparison with other prognostic factors in colon carcinoma. *Langenbecks Arch Surg*, **385**, 337-43.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, **386**, 623-7.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-9.
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, et al. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science*, **238**, 1411-3.
- Leschelle X, Robert V, Delpal S, Mouille B, Mayeur C, Martel P, Blachier F. (2002) Isolation of pig colonic crypts for cytotoxic assay of luminal compounds: effects of hydrogen sulfide, ammonia, and deoxycholic acid. *Cell Biol Toxicol*, **18**, 193-203.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br J Surg*, **89**, 845-60.
- Leuratti C, Watson MA, Deag EJ, Welch A, Singh R, Gottschalg E, Marnett LJ, Atkin W, Day NE, Shuker DE, Bingham SA. (2002) Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 267-73.
- Lewis CD, Laemmli UK. (1982) Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell*, **29**, 171-81.
- Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*, **80**, 224-34.

- Liegibel UM, Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. (2000) Application of confocal laser scanning microscopy to detect oxidative stress in human colon cells. *Free Radic Res*, **32**, 535-47.
- Liehr T, Thoma K, Kammler K, Gehring C, Ekici A, Bathke KD, Grehl HRB. (1995) Direct preparation of uncultured EDTA-treated or heparinized blood for interphase FISH analysis. *Appl Cytogenet*, **21**, 185-188.
- Liehr T, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U. (2002) Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes. *Int J Mol Med*, **9**, 335-9.
- Lof S, Poulsen HE. (2000) Antioxidant intervention studies related to DNA damage, DNA repair and gene expression. *Free Radic Res*, **33**, S67-83.
- Macaluso M, Russo G, Cinti C, Bazan V, Gebbia N, Russo A. (2002) Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *J Cell Physiol*, **192**, 125-30.
- Madden PW. (1987) The evaluation of endothelial damage following corneal storage: a comparison of staining methods and the value of scanning electron microscopy. *Curr Eye Res*, **6**, 1441-51.
- Mak S, Lehotay DC, Yazdanpanah M, Azevedo ER, Liu PP, Newton GE. (2000) Unsaturated aldehydes including 4-OH-nonenal are elevated in patients with congestive heart failure. *J Card Fail*, **6**, 108-14.
- Malins DC, Haimanot R. (1991) Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Res*, **51**, 5430-2.
- Marian B. (2002) In vitro models for the identification and characterization of tumor-promoting and protective factors for colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*, **40**, 1099-104.
- Marnett LJ. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**, 361-70.
- Marnett LJ, Plastaras JP. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*, **17**, 214-21.
- Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg.). Lehrbuch der Toxikologie. 2. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2004.
- Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Ohl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J. (1998) Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp Hematol*, **26**, 252-64.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, **32**, 595-603.
- May P, May E. (1999) Twenty years of *TP53* research: structural and functional aspects of the *TP53* protein. *Oncogene*, **18**, 7621-36.
- McBride TJ, Preston BD, Loeb LA. (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry*, **30**, 207-13.
- McCormick F. (1989) ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell*, **56**, 5-8.
- McCormick F. (1995) Ras-related proteins in signal transduction and growth control. *Mol Reprod Dev*, **42**, 500-6.
- McKay BC, Chen F, Perumalswami CR, Zhang F, Ljungman M. (2000) The tumor suppressor p53 can both stimulate and inhibit ultraviolet light-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*, **11**, 2543-51.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*, **288**, 47-63.
- McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS. (1998) Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in

- situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, **13**, 1-8.
- McKenna DJ, Rajab NF, McKeown SR, McKerr G, McKelvey-Martin VJ. (2003a) Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the *TP53* gene region in two human bladder carcinoma cell lines. *Radiat Res*, **159**, 49-56.
- McKenna DJ, Gallus M, McKeown SR, Downes CS, McKelvey-Martin VJ. (2003b) Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 879-90.
- Mendelsohn J (Ed.). The Molecular Basis of Cancer. 2nd Ed. Saunders Company Philadelphia 2001.
- Menke M, Meister A, Schubert I. (2000) N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in Vicia faba nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots. *Mutagenesis*, **15**, 503-6.
- Menzel T, Melcher R, Koehler S, Dusel G, Backhaus K, Ott G, Breithaupt W, Al-Taie O, Schaubert J, Gostner A, Scheppach W, Luhrs H. (2004) Establishment of a colonic adenoma cell line (GEK1-2): spectral karyotype analysis and functional characterization. *Int J Colorectal Dis*, **19**, 12-7.
- Mills SJ, Mathers JC, Chapman PD, Burn J, Gunn A. (2001) Colonic crypt cell proliferation state assessed by whole crypt microdissection in sporadic neoplasia and familial adenomatous polyposis. *Gut*, **48**, 41-6.
- Mitelman F (Ed.). ISCN 1995. An international system for human cytogenetic nomenclature. Karger Basel 1995.
- Miyahara M, Saito A, Ito H, Toyoda M. (2000) Capability for identification of gamma-irradiated bovine liver by new high sensitivity Comet-Assay. *Biol Pharm Bull*, **23**, 1399-405.
- Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, et al. (1994) Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, **54**, 3011-20.
- Moller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. (2000) The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 1005-15.
- Munkholm P. (2003) Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, **18**, S1-5.
- Nathke IS, Adams CL, Polakis P, Sellin JH, Nelson WJ. (1996) The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol*, **134**, 165-79.
- NCBI. (2003) National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Nelson RL. (2001) Iron and colorectal cancer risk: human studies. *Nutr Rev*, **59**, 140-8.
- Nestmann ER, Bryant DW, Carr CJ. (1996) Toxicological significance of DNA adducts: summary of discussions with an expert panel. *Regul Toxicol Pharmacol*, **24**, 9-18.
- Norat T, Riboli E. (2002) Fruit and vegetable consumption and risk of cancer of the digestive tract: meta-analysis of published case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ*, **156**, 123-5.
- Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. (2002) Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*, **98**, 241-56.
- Oberreuther-Moschner DL. Nachweis oxidativer DNA-Schäden in Colonzellen als Basis für die Entwicklung von Biomarkermethoden. Technische Universität München, Diss. 2002.
- Olive PL, Banath JP. (1992) Growth fraction measured using the comet assay. *Cell Prolif*, **25**, 447-57.
- Olive PL. (2002) The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol*, **203**, 179-94.

- Ono M, Murakami T, Kudo A, Isshiki M, Sawada H, Segawa A. (2001) Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy. *J Histochem Cytochem*, **49**, 305-12.
- Oren M, Rotter V. (1999) Introduction: TP53--the first twenty years. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 9-11.
- Osnes LT, Westvik AB, Kierulf P. (1994) Procoagulant and profibrinolytic activities of cryopreserved human monocytes. *Thromb Res*, **76**, 373-83.
- Osswald K, Mittas A, Glei M, Pool-Zobel BL. (2003) New revival of an old biomarker: characterisation of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutat Res*, **544**, 321-9.
- Ostling O, Johanson KJ. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **123**, 291-8.
- Pedersen G, Saermark T, Giese B, Hansen A, Drag B, Brynskov J. (2000a) A simple method to establish short-term cultures of normal human colonic epithelial cells from endoscopic biopsy specimens. Comparison of isolation methods, assessment of viability and metabolic activity. *Scand J Gastroenterol*, **35**, 772-80.
- Pedersen G, Saermark T, Bendtzen K, Brynskov J. (2000b) Cultures of human colonic epithelial cells isolated from endoscopical biopsies from patients with inflammatory bowel disease. Effect of IFNgamma, TNFalpha and IL-1beta on viability, butyrate oxidation and IL-8 secretion. *Autoimmunity*, **32**, 255-63.
- Peters JC. (2003) Dietary fat and body weight control. *Lipids*, **38**, 123-7.
- Peters WHM, Boon CEW, Roelofs HMJ, Wobbes T. (1992) Expression of drug-metabolizing enzymes and P-170 glycoprotein in colorectal carcinoma and normal mucosa. *Gastroenterology*, **103**, 448-455.
- Pfeifer GP. (2000) p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res*, **450**, 155-66.
- Polakis P. (1997) The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*, **1332**, F127-47.
- Pool-Zobel BL, Leucht U. (1997) Induction of DNA damage by risk factors of colon cancer in human colon cells derived from biopsies. *Mutat Res*, **375**, 105-15.
- Pool-Zobel BL, Abrahamse SL, Collins AR, Kark W, Gugler R, Oberreuther D, Siegel EG, Treptow-van Lishaut S, Rechkemmer G. (1999a) Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 609-14.
- Pool-Zobel BL, Bub A, Schroder N, Rechkemmer G. (1999b) Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur J Nutr*, **38**, 227-34.
- Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, Liegibel UM, Sittlington J, Rowland I, Wahala K, Rechkemmer G. (2000) Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis*, **21**, 1247-52.
- Pool-Zobel BL, van Loo J, Rowland I, Roberfroid MB. (2002) Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr*, **87**, S273-81.
- Potten CS. (1986) Cell cycles in cell hierarchies. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **49**, 257-78.
- Potten CS, Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, **110**, 1001-20.
- Potter JD. (1999) Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 916-32.
- Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulsom R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF, Tomlinson IP, Wright NA. (2003) Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res*, **63**, 3819-25.

- Pryor WA. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol*, **48**, 657-67.
- Rapp A, Bock C, Dittmar H, Greulich KO. (1999) Comet-FISH used to detect UV-A sensitive regions in the whole human genome and on chromosome 8. *Neoplasma*, **46**, S99-101.
- Rapp A, Bock C, Dittmar H, Greulich KO. (2000) UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J Photochem Photobiol B*, **56**, 109-17.
- Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, Hamilton SR. (1999) Genetic epidemiology of mutated *KRAS* proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut*, **44**, 826-33.
- Rauli S, Puppo MD, Magni F, Kienle MG. (1998) Validation of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-trans-nonenal measurement in plasma by NICI-GC-MS. *J Biochem (Tokyo)*, **123**, 918-23.
- Renahan AG, O'Dwyer ST, Haboubi NJ, Potten CS. (2002) Early cellular events in colorectal carcinogenesis. *Colorectal Dis*, **4**, 76-89.
- Reno F, Falcieri E, Luchetti F, Burattini S, Papa S. (1997) Discrimination of apoptotic cells in flow cytometry using trypan blue and FDA. *Eur J Histochem*, **41**, S115-6.
- Richter M, Jurek D, Wrba F, Kaserer K, Wurzer G, Karner-Hanusch J, Marian B. (2002) Cells obtained from colorectal microadenomas mirror early premalignant growth patterns in vitro. *Eur J Cancer*, **38**, 1937-45.
- Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C. (1999) A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis*, **20**, 2311-6.
- Robert Koch Institut. Dachdokumentation Krebs, Interaktives Datenangebot zur Epidemiologie von Krebserkrankungen in Deutschland. Berlin 2003.
- Robert ME, Singh SK, Ikuma M, Jain D, Ardito T, Binder HJ. (2001) Morphology of isolated colonic crypts. *Cells Tissues Organs*, **168**, 246-51.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, Morozzi G. (2001) Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis*, **22**, 1675-80.
- Rydberg B, Johanson KJ. (1975) Radiation-induced DNA strand breaks and their rejoining in crypt and villous cells of the small intestine of the mouse. *Radiat Res*, **64**, 281-92.
- Rydberg B. (1984) Detection of DNA strand breaks in single cells using flow cytometry. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, **46**, 521-7.
- Sage E. (1993) Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol*, **57**, 163-74.
- Sahi J, Nataraja SG, Layden TJ, Goldstein JL, Moyer MP, Rao MC. (1998) Cl⁻ transport in an immortalized human epithelial cell line (NCM460) derived from the normal transverse colon. *Am J Physiol*, **275**, C1048-57.
- Sandstroem B. (1965) Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. I. Influence of the culture method on cell morphology and growth pattern. *Exp Cell Res*, **37**, 552-68.
- Santanam N, Ramachandran S, Parthasarathy S. (1998) Oxygen radicals, antioxidants, and lipid peroxidation. *Semin Reprod Endocrinol*, **16**, 275-80.
- Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT. (1997) Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res*, **232**, 407-11.
- Sauvaigo S, Serres C, Signorini N, Emonet N, Richard MJ, Cadet J. (1998) Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Anal Biochem*, **259**, 1-7.
- Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U, Rapp A, Greulich KO, Pool-Zobel BL. (2003a) Putative colon cancer risk factors damage global DNA and

- TP53* in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol*, **41**, 655-64.
- Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL. (2003b) Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res*, **526**, 19-32.
- Schorkhuber M, Karner-Hanusch J, Sedivy R, Ellinger A, Armbruster C, Schulte-Hermann R, Marian B. (1998) Survival of normal colonic epithelial cells from both rats and humans is prolonged by coculture with rat embryo colonic fibroblasts. *Cell Biol Toxicol*, **14**, 211-23.
- Schuler D, Otteneider M, Sagelsdorff P, Eder E, Gupta RC, Lutz WK. (1997) Comparative analysis of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P- and ³³P-postlabeling and electrochemical detection. *Carcinogenesis*, **18**, 2367-71.
- Schwenk M, Dechelotte P, Riemenschneider T. (1992) Isolation of human colonic crypts for study of xenobiotics metabolism. *Am J Physiol*, **262**, G359-63.
- Scott N, Bell SM, Sagar P, Blair GE, Dixon MF, Quirke P. (1993) *TP53* expression and *KRAS* mutation in colorectal adenomas. *Gut*, **34**, 621-4.
- Seidelin JB, Horn T, Nielsen OH. (2003) Simple and efficient method for isolation and cultivation of endoscopically obtained human colonocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **285**, G1122-8.
- Selley ML, Bartlett MR, McGuinness JA, Hapel AJ, Ardlie NG. (1989) Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr*, **488**, 329-40.
- Senger G, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K. (1997) Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenat Diagn*, **17**, 369-74.
- Seyffert W (Hrsg.). Lehrbuch der Genetik. 2. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag 2003.
- Shanmugathan M, Jothy S. (2000) Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer. *Pathol Int*, **50**, 273-9.
- Sharpe CR, Siemiatycki JA, Rachet BP. (2002) The effects of smoking on the risk of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, **45**, 1041-50.
- Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B. (2001) Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 2640-5.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, **175**, 184-91.
- Skrzydowska E, Stankiewicz A, Sulkowska M, Sulkowski S, Kasacka I. (2001) Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health A*, **64**, 213-22.
- Slamenova D, Kuboskova K, Horvathova E, Robichova S. (2002) Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited Methylene Blue. *Cancer Lett*, **177**, 145-53.
- Slattery ML, Potter JD, Duncan DM, Berry TD. (1997) Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids. *Int J Cancer*, **73**, 670-7.
- Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Schaffer D, Leppert M. (1999) Methylene-tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 513-8.
- Slattery ML. (2000) Diet, lifestyle, and colon cancer. *Semin Gastrointest Dis*, **11**, 142-6.

- Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, Potter J, Schaffer D, Samowitz WS. (2000) Associations between dietary intake and Ki-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res*, **60**, 6935-41.
- Slattery ML, Potter JD. (2002) Physical activity and colon cancer: confounding or interaction? *Med Sci Sports Exerc*, **34**, 913-9.
- Slattery ML, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Anderson K, Samowitz W. (2002) Diet activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 541-8.
- Slijepcevic P. (2004) Is there a link between telomere maintenance and radiosensitivity? *Radiat Res*, **161**, 82-6.
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, **531**, 231-51.
- Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR. (2002) Mutations in *APC*, Kirsten-ras, and *TP53*-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9433-9438.
- Smith TK, Mithen R, Johnson IT. (2003) Effects of Brassica vegetable juice on the induction of apoptosis and aberrant crypt foci in rat colonic mucosal crypts in vivo. *Carcinogenesis*, **24**, 491-5.
- Sram RJ, Binkova B. (2000) Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environ Health Perspect*, **108**, S57-70.
- Statistisches Bundesamt. Amtliche Todesursachenstatistik 2001. Wiesbaden 2003.
- StCroix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW. (2000) Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*, **289**, 1197-202.
- Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S. (1998) Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer*, **78**, 1152-5.
- Terstappen LW, Meiners H, Loken MR. (1989) A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations. *J Immunol Methods*, **123**, 103-12.
- Tice RR, Andrews PW, Singh NP. (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Sci*, **53**, 291-301.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. (2000) Single cell gel/Comet-Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, **35**, 206-21.
- Tiemersma EW, Wark PA, Ocke MC, Bunschoten A, Otten MH, Kok FJ, Kampman E. (2003) Alcohol consumption, alcohol dehydrogenase 3 polymorphism, and colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**, 419-25.
- Tkeshelashvili LK, McBride T, Spence K, Loeb LA. (1991) Mutation spectrum of copper-induced DNA damage. *J Biol Chem*, **266**, 6401-6.
- Toyokuni S, Luo XP, Tanaka T, Uchida K, Hiai H, Lehotay DC. (1997) Induction of a wide range of C(2-12) aldehydes and C(7-12) acylolins in the kidney of Wistar rats after treatment with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Free Radic Biol Med*, **22**, 1019-27.
- Tucker JD, Senft JR. (1994) Analysis of naturally occurring and radiation-induced breakpoint locations in human chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat Res*, **140**, 31-6.
- van Iersel ML, Ploemen JP, LoBello M, Federici G, van Bladeren PJ. (1997) Interactions of alpha, beta-unsaturated aldehydes and ketones with human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact*, **108**, 67-78.

- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, **319**, 525-32.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000) Surfing the *TP53* network. *Nature*, **408**, 307-10.
- Wacker M, Schuler D, Wanek P, Eder E. (2000) Development of a (32)P-postlabeling method for the detection of 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal in vivo. *Chem Res Toxicol*, **13**, 1165-73.
- Wacker M, Wanek P, Eder E, Hylla S, Gostner A, Scheppach W. (2002) Effect of enzyme-resistant starch on formation of 1,N(2)-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal and cell proliferation in the colonic mucosa of healthy volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 915-20.
- Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. (1994) Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, **33**, 4449-53.
- Waldeck AR, Stocker R. (1996) Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: insights obtained from kinetic modeling. *Chem Res Toxicol*, **9**, 954-64.
- Ward JF, Evans JW, Limoli CL, Calabro-Jones PM. (1987) Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer*, **8**, S105-12.
- Ward JF. (1988) DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **35**, 95-125.
- Werther K, Normark M, Hansen BF, Brunner N, Nielsen HJ. (2000) The use of the CELlection kit in the isolation of carcinoma cells from mononuclear cell suspensions. *J Immunol Methods*, **238**, 133-41.
- WHO. The World Health Report 2002, Genf 2003.
- Winton DJ, Brooks RA. (1998) Analysis of DNA damage and repair accompanying differentiation in the intestinal crypt. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **353**, 895-902.
- Wolffe AP. (1994) Inheritance of chromatin states. *Dev Genet*, **15**, 463-70.
- Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, Essigmann JM. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, **29**, 7024-32.
- World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research Washington DC 1997.
- Wright NA, Poulson R. (2002) Top down or bottom up? Competing management structures in the morphogenesis of colorectal neoplasms. *Gut*, **51**, 306-8.
- Xu BJ, Caprioli RM, Sanders ME, Jensen RA. (2002) Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, **13**, 1292-7.
- Yu YX, Heller A, Liehr T, Smith CC, Aurelian L. (2001) Expression analysis and chromosome location of a novel gene (H11) associated with the growth of human melanoma cells. *Int J Oncol*, **18**, 905-11.
- Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. (1999) Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen*, **33**, 3-20.
- Zappa U, Boretti G, Graf H, Case D. (1992) Numbers and vitality of leukocytes in pocket washings of untreated periodontitis lesions in humans utilizing a novel intracrevicular lavage technique. *J Periodontal Res*, **27**, 274-84.

ANHANG

Anhang I: Material**Geräte**

Analysenwaage (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Bildauswertungssystem (Comet-Assay II 1.03)	Perspective Instruments, Halstead, UK
Bildauswertungssystem (KOMET 4.0)	Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK
Brutschrank (Steri Cult 200)	Forma Scientific, Inc., USA
Dynal MPC-1	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Dynal MPC-E/E-1	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Elektrophoreseeinheit (Power Pack P25)	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Filtersätze (02; 09 und 15)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Fluoreszenzmikroskop (Axiolab HB50)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Heizrührplatte (Monotherm variomag)	H+P Labortechnik GmbH, München
Kamera (KPO-D50 Color Digital)	Hitachi Denshi, Ltd., Japan
Kamera (MicroMAX Digital CCD)	BFI OPTILAS GmbH, Puchheim
Konfokales Fluoreszenzmikroskop (Axiovert M100)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Laborbrenner (Gasprofi)	Wartwig Labor- und Dentaltechnik, Göttingen
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikrowellengerät (HMT 700B)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Minischüttler (MS1 Minishaker)	IKA-Werke, Staufen
Schüttelwasserbad	GFL mbH, Burgwedel
Sterile Werkbank (HeraSafe H12)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermomixer (Compact)	Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Tischzentrifuge (CR 4.22)	Jouan GmbH, Hanau
UV-vis Spektrophotometer (Cary 3B)	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Wärmeplatte (HP 9060)	Labotect GmbH, Göttingen
Wasserbad	Memert GmbH & Co. KG, Schwalbach
Zentrifuge (biofuge pico)	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

Arbeitsmittel

Deckgläser (24 x 24 mm; 24 x 70 mm)	Menzel, Braunschweig
Einmalpipetten (2-50 ml)	Fisher Scientific, Schwerte
Einmalspritzen Soft-Ject (1 ml)/ Norm-Ject (5-10 ml)	Henke, Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Handstückzähler	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Kanülen Sterican	B. Braun Medical AG, Emmenbrück
Metallbox (für Eiskühlung)	Fisher Scientific, Schwerte
Mikrotiterplatten (6-Well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Objektträger (einseitig aufgeraut)	Menzel, Braunschweig
Objektträger (Superfrost Color)	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten (steril)	NeoLab, Heidelberg
Petrischalen (35 x 10 mm)	Fisher Scientific, Schwerte
Pipetten (Research)	Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	Fisher Scientific, Schwerte
Pipettierhilfe (accu-jet)	Brand GmbH & Co, Wertheim
Präzisionsküvetten aus UV-Quarzglas	Hellma Optik GmbH, Jena
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorff-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sterilfilter Syringe Filter (0,22 µm)	Novodirekt GmbH, Kehl
Zellkulturflaschen (25 cm ² ; 75 cm ²)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Zellzählkammer nach Neubauer (geeicht)	Fisher Scientific, Schwerte

Chemikalien und Reagenzien

Agarose, Seakem HGT (normal melting).....	Biozym Diagnostics, Hameln
Agarose Sea Plaque GTG (low melting).....	Biozym Diagnostics, Hameln
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit.....	Alexis Corporation, Lausan, Schweiz
Antifade	Q BIOgene, Heidelberg
Collagenase P [$> 1,5$ U/mg]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dig-Fab-Fragmente AP	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM).....	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
DynaBeads M450 (rat anti mouse IgG1).....	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
DynaBeads M450 (anti-epithelial cell)	Dynal Biotech GmbH, Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
HNPP Fluorescent Detection Kit.....	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Hybrisol VI.....	Q BIOgene, Heidelberg
4-Hydroxy-2-nonenal	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden
MCDB	Biochrom, Berlin
Natrium-Lauroylsarcosinat.....	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Phosphatdetergenz (10 x PBD)	Q BIOgene, Heidelberg
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TP53-DNS-Sonde.....	Q BIOgene, Heidelberg
Trypsin (10 x).....	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Versen (1 x)	Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma-Aldrich, Steinheim bzw. Carl Roth, Karlsruhe bezogen.

Medien, Lösungen, Puffer

Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in doppelt destilliertem Wasser hergestellt und bei 4 °C gelagert.

Zellkultur, Gewebeaufarbeitung**Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep)**

Penicillin G.....	5000 U/ml
Streptomycin-Sulfat in phys. Kochsalzlösung	5000 µg/ml
Lagerung:-20 °C	

HT29clone19a-Zellkulturmedium

DMEM.....	450 ml
FCS	50 ml
PenStrep.....	5 ml

Trypsin-Versen-Lösung

Trypsin [10 x] 25 g/l in phys. Kochsalzlösung.....	11 ml
Versen [1 x] 0,2 g/l in phys. Kochsalzlösung.....	100 ml

L-15-Medium Leibovitz (+ Glutamin)

L-15-Medium Leibovitz	500 ml
Glutamin (200 mol/l).....	5 ml

LT97-Zellkulturmedium

MCDB-Medium	400 ml
L-15-Medium Leibovitz (+ Glutamin)	100 ml
FCS	2 % (v/v)
Insulin	10 µg/ml
Trijodthyronin	2×10^{-10} mol/l
Transferrin	2 µg/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Natriumselenit	5×10^{-9} mol/l
EGF	30 ng/ml
PenStrep	1 % (v/v)

Phosphate Buffered Saline (PBS)

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g/l
pH 7,3; autoklaviert	

Phosphate Buffered Saline (PBS) + Ca²⁺ + Mg²⁺

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,44 g/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 g/l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,13 g/l
pH 7,3; sterilfiltriert	

Phosphate Buffered Saline (PBS) + Na₂EDTA

Na ₂ EDTA	1,86 g/l
in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ lösen; pH 7,4; autoklaviert	

HBSS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

NaCl	8,0 g/l
KCl	0,4 g/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	0,06 g/l
K ₂ HPO ₄	0,06 g/l
Glucose	1,0 g/l
NaHCO ₃	0,35 g/l
Hepes	4,8 g/l
pH 7,4; sterilfiltriert	

Erythrozytenlysepuffer

NH ₄ Cl	155 µmol/l
KCl	5 µmol/l
EDTA	0,06 µmol/l
pH 7,0; sterilfiltriert	

Einfriermedium 1 (Primärmaterial)

DMEM	60 % (v/v)
FCS	20 % (v/v)
DMSO	20 % (v/v)
Lagerung: -20 °C	

Einfriermedium 2 (Primärmaterial)

DMEM.....	60 % (v/v)
FCS.....	30 % (v/v)
DMSO.....	10 % (v/v)
Lagerung: -20 °C	

Fluoreszenzfarbstoffe**DAPI-Stammlösung**

DAPI.....	10,5 mg
Methanol.....	10 ml
Lagerung: dunkel bei -20 °C; direkt vor Gebrauch 1:1000 in dd H ₂ O verdünnen	

Ethidiumbromid-Stammlösung

Ethidiumbromid.....	2 mg
PBS.....	10 ml
Lagerung: dunkel bei 4 °C; direkt vor Gebrauch 1:100 in dd H ₂ O verdünnen	

Fluoresceindiactetat-Stammlösung

Fluoresceindiactetat.....	5 mg
Aceton.....	1 ml
Lagerung: dunkel bei -80 °C; direkt vor Gebrauch 1:1000 in dd H ₂ O verdünnen	

Fluoresceindiactetat-Ethidiumbromid-Gebrauchslösung

Fluoresceindiactetat-Stammlösung.....	5 µl
Ethidiumbromid-Stammlösung.....	200 µl
PBS.....	4,8 ml
Lagerung: dunkel bei 4 °C	

Tris-EDTA-Puffer

Tris-HCl.....	10 mmol/l
EDTA.....	1 mmol/l
pH 8,0; autoklaviert	

DABCO-Antifade

DABCO.....	2,5 g
Tris-EDTA-Puffer.....	50 ml
Glycerol.....	50 ml

SYBRGreen-Gebrauchslösung

SYBRGreen [10.000 x].....	10 µl
DABCO-Antifade.....	10 ml
Lagerung: dunkel bei -20 °C	

Comet-Assay**Normal-Melting-Agarose (0,5 %)**

NMA.....	0,05 g
PBS.....	10 ml
Verwendung: 60 °C	

Low-Melting-Agarose (0,7 %)

LMA	0,07 g
PBS	10 ml
Verwendung: 38 °C	

Lyse-Stammlösung

NaCl	146,1 g/l
Na ₂ EDTA	37,2 g/l
Tris-Base	1,2 g/l
mit NaOH pH 10 einstellen	8 g/l
NaLauroylsarcosinat	10 g/l
pH 10; sterilfiltriert; Lagerung: RT	

Lyse-Gebrauchslösung

Lyse-Stammlösung	356 ml
DMSO	40 ml
TritonX-100	4 ml
pH 10; 400 ml Lyselösung (für 20 OT) werden jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.	

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (alkalischer Comet-Assay)

NaOH-Stammlösung (10 mol/l)	30 ml/l
EDTA-Stammlösung (200 mmol/l)	5 ml/l
pH 13; 2 l Elektrophoresepuffer (für 20 OT) werden jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.	

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (neutraler Comet-Assay)

NaCl	32 g/l
EDTA-Stammlösung (200 mmol/l)	5 ml/l
pH 8; 2 l Elektrophoresepuffer (für 20 OT) werden jeweils frisch angesetzt und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.	

Neutralisationspuffer (0,4 mol/l)

Tris-Base	48,5 g/l
pH 7,5; autoklaviert; Lagerung: RT	

Comet-FISH**2 x SSC**

NaCl	0,3 mol/l
Natriumcitrat	0,03 mol/l
pH 7,2; autoklaviert	

Hybrisol

Formamid	650 µl/ml
in 2 x SSC lösen; pH 7,4; sterilfiltriert	

PBD [1 x]

NaH ₂ PO ₄	15,6 g/l
Na ₂ HPO ₄	17,8 g/l
Nonidet-P40	1 g/l
pH 8,0; Lagerung: RT	

Fluoreszenzfarbstoffe

Es wurden die jeweiligen Absorptions- und Emissionswellenlängen sowie die verwendeten ZEISS-Filtersätze angegeben.

DAPI

Absorption:	359 nm
Emission:	461 nm
ZEISS-Filtersatz:	02

Ethidiumbromid

Absorption:	510 nm; 523 nm
Emission:	595 nm; 605 nm
ZEISS-Filtersatz:	15

FITC

Absorption:	490 nm; 494 nm
Emission:	520 nm; 525 nm
ZEISS-Filtersatz:	09

Fluoresceindiacetat

Absorption:	494 nm
Emission:	520 nm
ZEISS-Filtersatz:	09

Propidiumjodid

Absorption:	536 nm; 538 nm
Emission:	617 nm
ZEISS-Filtersatz:	15

SYBRGreen

Absorption:	494 nm
Emission:	521 nm
ZEISS-Filtersatz:	09

TexasRed

Absorption:	595 nm
Emission:	620 nm
ZEISS-Filtersatz:	15

Mess- und Auswertungssoftware

CaryWin UV Bio 2.0	Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Comet-Assay II 1.03	Perceptive Instruments, Halstead, UK
GraphPadPrism 2.01 und 4.0	GraphPad Software Incorporated, SanDiego
KOMET 4.0	Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK
MetaMorph 4.1.5	Visitron Systems GmbH, Puchheim
MetaView Imaging Software	Visitron Systems GmbH, Puchheim
Microsoft Office 97 und 2000 für Windows	Microsoft Corporation, USA

Anhang II: Tabellen

Tabelle 14: Auswertung der Patientendatenblätter (Kolonbiopsien).

Patient	Geschlecht	Alter [a]	BMI [kg/m ²]	Raucher	Biopsiezahl
1	w	84	20,7	nein	4
2	m	68	25,3	ja	5
3	w	48	26,8	nein	6
4	w	58	24	nein	4
5	w	59	35,7	nein	3
6	w	48	32,5	nein	4
7	w	43	24,1	nein	5
8	w	63	29	nein	3
9	m	64	29,1	nein	3
10	m	58	29,9	nein	4
11	w	78	28,7	nein	4
12	w	44	23,7	nein	2
13	w	55	32,9	nein	5
14	m	65	--	--	4
15	w	74	--	nein	4
16	m	28	--	nein	3
17	w	77	--	nein	5
18	w	39	20,7	nein	5

w: weiblich; m: männlich, --: keine Angabe im Patientendatenblatt.

Tabelle 15: Auswertung der Patientendatenblätter (Kolongewebebeobachten).

Patient	Geschlecht	Alter [a]	BMI [kg/m ²]	Raucher
1	m	63	--	nein
2	m	59	--	nein
3	w	--	26,6	nein
4	w	63	26,2	nein
5	m	64	30,1	nein
6	w	59	26	nein
7	--	--	--	--
8	--	--	--	--
9	w	60	--	nein
10	m	68	24	nein
11	w	79	--	nein
12	m	60	23,5	nein
13	w	74	24,4	nein
14	w	41	25,6	nein
15	w	43	37,6	nein
16	m	59	22,9	nein
17	m	30	23,2	--
18	w	60	29,3	--
19	--	--	--	--
20	--	--	--	--
21	w	72	26,8	nein
22	w	51	25,2	nein
23	--	--	--	--
24	--	--	--	--
25	w	59	23,7	nein
26	--	--	--	--
27	--	--	--	--
28	w	65	23,7	nein
29	--	--	--	--
30	w	71	29,7	nein

Patient	Geschlecht	Alter [a]	BMI [kg/m ²]	Raucher
31	m	64	22,8	nein
32	w	49	23,7	nein
33	--	--	--	--
34	--	--	--	--
35	--	--	--	--
36	--	--	--	--
37	w	61	26,9	nein
38	m	60	22,9	nein
39	--	--	--	--
40	--	--	--	--
41	m	65	23,9	nein
42	w	81	24,2	ja
43	m	75	23,8	nein
44	m	88	24,4	nein
45	--	--	--	--
46	m	18	23,9	nein
47	--	--	--	--
48	m	61	27,2	nein
49	--	--	--	--
50	m	59	26,2	nein
51	m	68	24,7	ja
52	--	--	--	--
53	--	--	--	--
54	m	71	--	--
55	--	--	--	--
56	m	67	25,7	nein
57	--	--	--	--
58	w	65	35,3	nein
59	--	--	--	--
60	--	--	--	--
61	--	--	--	--
62	--	--	--	--
63	m	62	--	ja
64	w	79	22,9	nein
65	w	69	24	nein
66	w	43	19,1	--
67	--	--	--	--
68	w	69	34,1	--
69	m	62	24,9	nein
70	w	60	32,4	nein
71	--	--	--	--

w: weiblich; m: männlich, --: keine Angabe im Patientendatenblatt.

Tabelle 16: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	PBS-Kontrolle	18,8 µM H ₂ O ₂	37,5 µM H ₂ O ₂	75,0 µM H ₂ O ₂	150 µM H ₂ O ₂
1	88,3 ± 5,4 %	63,1 ± 8,3 %	38,8 ± 7,5 %	16,9 ± 4,3 %	10,0 ± 3,9 %
2	10,0 ± 4,9 %	27,7 ± 7,6 %	41,0 ± 7,0 %	44,5 ± 9,1 %	35,2 ± 6,8 %
3	1,5 ± 1,1 %	6,3 ± 1,4 %	14,4 ± 3,9 %	23,9 ± 3,9 %	28,3 ± 3,5 %
4	0,2 ± 0,5 %	3,0 ± 1,4 %	5,8 ± 3,0 %	14,7 ± 4,0 %	26,6 ± 3,9 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 9).

Tabelle 17: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	DMSO-Kontrolle	400 µM Hexenal	800 µM Hexenal	1200 µM Hexenal	1600 µM Hexenal
1	85,9 ± 3,8 %	56,6 ± 14,9 %	29,0 ± 11,7 %	16,6 ± 6,4 %	9,4 ± 7,3 %
2	11,0 ± 4,2 %	28,6 ± 12,0 %	36,1 ± 9,2 %	37,3 ± 9,1 %	30,1 ± 7,2 %
3	2,0 ± 1,0 %	10,4 ± 4,0 %	20,3 ± 6,4 %	25,1 ± 2,6 %	32,4 ± 5,9 %
4	1,2 ± 0,7 %	4,3 ± 2,7 %	14,7 ± 6,6 %	21,0 ± 5,7 %	28,1 ± 4,8 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 9).

Tabelle 18: HNE-geschädigte Primärzellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	EtOH-Kontrolle	100 µM HNE	150 µM HNE	200 µM HNE	250 µM HNE
1	88,4 ± 3,4 %	58,5 ± 6,6 %	35,2 ± 3,3 %	13,7 ± 4,7 %	7,4 ± 4,2 %
2	8,9 ± 3,3 %	26,1 ± 10,9 %	38,7 ± 7,1 %	37,7 ± 7,0 %	33,3 ± 7,7 %
3	1,7 ± 1,1 %	11,3 ± 5,6 %	16,2 ± 7,8 %	27,7 ± 4,7 %	32,2 ± 5,0 %
4	1,0 ± 0,8 %	4,3 ± 2,9 %	9,9 ± 3,5 %	20,9 ± 6,2 %	27,2 ± 6,7 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 10).

Tabelle 19: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	PBS-Kontrolle	18,8 µM H ₂ O ₂	37,5 µM H ₂ O ₂	75,0 µM H ₂ O ₂	150 µM H ₂ O ₂
1	87,9 ± 6,2 %	71,5 ± 7,2 %	48,7 ± 10,1 %	27,6 ± 16,8 %	13,1 ± 13,3 %
2	9,0 ± 4,1 %	22,9 ± 6,6 %	32,1 ± 7,6 %	38,5 ± 11,2 %	33,1 ± 8,4 %
3	2,3 ± 1,8 %	4,4 ± 2,3 %	13,4 ± 6,5 %	19,5 ± 8,0 %	29,6 ± 4,7 %
4	0,7 ± 0,7 %	1,2 ± 0,8 %	5,8 ± 2,9 %	14,3 ± 7,4 %	24,3 ± 12,6 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 9).

Tabelle 20: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	DMSO-Kontrolle	400 µM Hexenal	800 µM Hexenal	1200 µM Hexenal	1600 µM Hexenal
1	88,6 ± 6,6 %	57,4 ± 14,7 %	25,2 ± 11,4 %	8,1 ± 8,0 %	3,9 ± 6,1 %
2	9,5 ± 4,7 %	32,0 ± 11,2 %	46,8 ± 7,5 %	36,6 ± 8,6 %	27,3 ± 11,5 %
3	1,1 ± 1,3 %	7,6 ± 4,9 %	18,6 ± 7,7 %	32,0 ± 8,0 %	37,1 ± 8,3 %
4	0,8 ± 1,0 %	3,0 ± 2,5 %	9,4 ± 4,3 %	23,3 ± 9,4 %	31,6 ± 9,3 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 10).

Tabelle 21: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Zuordnung der im Rahmen der Comet-FISH-Versuche ausgewerteten Zellen zu den Schädigungskategorien 1-4.

Schädigungsklassen	EtOH-Kontrolle	100 µM HNE	150 µM HNE	200 µM HNE	250 µM HNE
1	86,5 ± 5,0 %	59,4 ± 15,2 %	34,2 ± 9,2 %	17,5 ± 5,3 %	6,9 ± 3,7 %
2	11,0 ± 4,0 %	28,1 ± 9,7 %	38,6 ± 5,0 %	39,5 ± 9,3 %	30,3 ± 8,8 %
3	1,4 ± 1,3 %	7,7 ± 4,7 %	17,1 ± 6,2 %	25,2 ± 8,2 %	31,8 ± 5,2 %
4	1,2 ± 0,6 %	4,8 ± 2,7 %	10,1 ± 5,2 %	17,7 ± 6,8 %	31,0 ± 10,2 %
Summe	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 9).

Tabelle 22: Hybridisierungsgüte [%] in H₂O₂-geschädigten primären Kolonzellen.

Primäre Kolonzellen	H ₂ O ₂ -Schädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
PBS-Kontrolle	84,6 ± 7,8 %	85,7 ± 1,0 %	86,8 ± 3,3 %
18,8 µM	78,8 ± 7,0 %	82,3 ± 1,8 %	82,3 ± 2,9 %
37,5 µM	80,5 ± 8,7 %	81,4 ± 1,2 %	81,8 ± 3,8 %
75,0 µM	79,3 ± 8,8 %	77,8 ± 5,3 %	81,2 ± 1,9 %
150 µM	83,1 ± 1,7 %	82,8 ± 4,6 %	84,0 ± 1,9 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 23: Hybridisierungsgüte [%] in Hexenal-geschädigten primären Kolonzellen.

Primäre Kolonzellen	Hexenalschädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
DMSO-Kontrolle	87,9 ± 3,2 %	80,4 ± 0,4 %	85,5 ± 3,0 %
400 µM	83,9 ± 1,3 %	77,2 ± 2,1 %	72,1 ± 13,6 %
800 µM	82,4 ± 3,3 %	82,8 ± 4,3 %	69,3 ± 16,7 %
1200 µM	79,4 ± 8,3 %	78,5 ± 4,1 %	75,8 ± 9,1 %
1600 µM	81,0 ± 0,3 %	81,8 ± 3,9 %	80,0 ± 8,7 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 24: Hybridisierungsgüte [%] in HNE-geschädigten primären Kolonzellen.

Primäre Kolonzellen	HNE-Schädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
EtOH-Kontrolle	85,2 ± 5,6 %	75,8 ± 3,6 %	82,5 ± 2,8 %
100 µM	81,3 ± 7,5 %	80,0 ± 4,2 %	74,2 ± 13,7 %
150 µM	82,4 ± 2,6 %	76,9 ± 9,9 %	79,1 ± 3,5 %
200 µM	83,2 ± 5,8 %	75,3 ± 3,7 %	80,3 ± 8,4 %
250 µM	83,9 ± 9,0 %	80,5 ± 0,8 %	71,2 ± 12,5 %

Angaben als MW ± SD (n = 3-4).

Tabelle 25: Hybridisierungsgüte [%] in H₂O₂-geschädigten LT97-Zellen.

LT97-Kolonadenomzellen	H ₂ O ₂ -Schädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
PBS-Kontrolle	84,7 ± 3,8 %	82,4 ± 4,5 %	84,8 ± 3,2 %
18,8 µM	88,0 ± 3,2 %	79,2 ± 7,4 %	81,5 ± 1,5 %
37,5 µM	85,7 ± 1,2 %	79,8 ± 4,5 %	79,9 ± 4,1 %
75,0 µM	87,6 ± 3,6 %	81,1 ± 3,3 %	78,0 ± 5,3 %
150 µM	84,9 ± 2,5 %	82,9 ± 2,3 %	78,1 ± 3,6 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 26: Hybridisierungsgüte [%] in Hexenal-geschädigten LT97-Zellen.

LT97-Kolonadenomzellen	Hexenalschädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
DMSO-Kontrolle	87,7 ± 5,0 %	83,8 ± 3,3 %	86,8 ± 2,8 %
400 µM	87,8 ± 5,9 %	81,7 ± 3,8 %	82,9 ± 3,8 %
800 µM	82,3 ± 2,9 %	79,4 ± 1,8 %	81,4 ± 4,3 %
1200 µM	82,4 ± 7,7 %	83,1 ± 1,0 %	84,5 ± 5,9 %
1600 µM	82,2 ± 10,2 %	81,7 ± 3,9 %	86,1 ± 1,8 %

Angaben als MW ± SD (n = 3-4).

Tabelle 27: Hybridisierungsgüte [%] in HNE-geschädigten LT97-Zellen.

LT97-Kolonadenomzellen	HNE-Schädigung		
Sonde	<i>APC</i>	<i>KRAS</i>	<i>TP53</i>
EtOH-Kontrolle	86,6 ± 5,0 %	86,0 ± 5,8 %	85,1 ± 3,8 %
100 µM	86,6 ± 5,5 %	82,7 ± 5,3 %	83,4 ± 2,5 %
150 µM	84,0 ± 4,5 %	80,9 ± 3,2 %	80,9 ± 1,5 %
200 µM	82,9 ± 4,6 %	82,7 ± 3,2 %	83,8 ± 3,1 %
250 µM	84,1 ± 5,5 %	84,2 ± 2,5 %	83,0 ± 3,3 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 28: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der *APC*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
<i>APC</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	94,8 ± 3,7 %	4,2 ± 3,3 %	1,0 ± 0,3 %	100 %
18,8 µM	86,4 ± 4,1 %	10,3 ± 1,4 %	3,3 ± 3,4 %	100 %
37,5 µM	77,6 ± 8,6 %	14,9 ± 6,0 %	7,5 ± 2,7 %	100 %
75,0 µM	63,1 ± 7,9 %	23,1 ± 3,9 %	13,8 ± 6,3 %	100 %
150 µM	57,4 ± 11,9 %	27,6 ± 4,4 %	15,0 ± 7,6 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 29: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der *KRAS*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
<i>KRAS</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	95,9 ± 2,6 %	2,3 ± 2,0 %	1,8 ± 0,9 %	100 %
18,8 µM	86,0 ± 1,6 %	9,3 ± 1,2 %	4,7 ± 1,8 %	100 %
37,5 µM	75,8 ± 1,1 %	15,4 ± 2,7 %	8,8 ± 3,4 %	100 %
75,0 µM	64,0 ± 4,1 %	23,2 ± 1,3 %	12,8 ± 3,6 %	100 %
150 µM	55,1 ± 6,8 %	28,5 ± 0,6 %	16,4 ± 6,8 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 30: H₂O₂-geschädigte Primärzellen: Lage der *TP53*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
<i>TP53</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	97,5 ± 1,2 %	2,5 ± 1,2 %	0,0 ± 0,0 %	100 %
18,8 µM	87,2 ± 7,5 %	9,3 ± 4,7 %	3,5 ± 3,0 %	100 %
37,5 µM	76,4 ± 9,1 %	19,1 ± 5,4 %	4,5 ± 4,0 %	100 %
75,0 µM	53,4 ± 5,6 %	30,3 ± 4,0 %	16,3 ± 2,8 %	100 %
150 µM	41,7 ± 2,9 %	31,1 ± 3,2 %	27,2 ± 2,5 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 31: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der *APC*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	Hexenalschädigung			
<i>APC</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	94,7 ± 2,1 %	3,8 ± 1,6 %	1,5 ± 0,8 %	100 %
400 µM	86,2 ± 2,6 %	9,0 ± 1,8 %	4,8 ± 1,0 %	100 %
800 µM	73,1 ± 5,9 %	17,6 ± 4,2 %	9,3 ± 1,7 %	100 %
1200 µM	65,0 ± 4,6 %	22,7 ± 1,0 %	12,3 ± 4,1 %	100 %
1600 µM	53,5 ± 2,9 %	28,9 ± 1,4 %	17,6 ± 1,5 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 32: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der *KRAS*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	Hexenalschädigung			
<i>KRAS</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	95,2 ± 0,8 %	3,1 ± 0,7 %	1,7 ± 0,6 %	100 %
400 µM	82,9 ± 7,9 %	12,0 ± 4,6 %	5,1 ± 3,7 %	100 %
800 µM	67,1 ± 5,4 %	21,6 ± 1,8 %	11,3 ± 3,7 %	100 %
1200 µM	61,4 ± 2,0 %	25,4 ± 1,7 %	13,2 ± 2,0 %	100 %
1600 µM	51,9 ± 2,9 %	32,7 ± 1,1 %	15,4 ± 2,1 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 33: Hexenal-geschädigte Primärzellen: Lage der *TP53*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	Hexenalschädigung			
<i>TP53</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	94,3 ± 1,0 %	4,5 ± 1,8 %	1,2 ± 1,0 %	100 %
400 µM	80,1 ± 5,5 %	12,6 ± 3,3 %	7,3 ± 2,2 %	100 %
800 µM	59,4 ± 10,6 %	25,0 ± 2,8 %	15,6 ± 8,1 %	100 %
1200 µM	48,7 ± 7,7 %	26,4 ± 3,6 %	24,9 ± 4,5 %	100 %
1600 µM	43,3 ± 4,4 %	30,1 ± 9,2 %	26,6 ± 12,7 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 34: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der *APC*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	HNE-Schädigung			
<i>APC</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	95,3 ± 2,0 %	4,2 ± 1,9 %	0,5 ± 0,5 %	100 %
100 µM	81,2 ± 6,8 %	13,1 ± 3,3 %	5,7 ± 3,9 %	100 %
150 µM	69,6 ± 8,9 %	20,1 ± 6,4 %	10,3 ± 3,3 %	100 %
200 µM	61,0 ± 5,7 %	24,0 ± 2,9 %	15,0 ± 5,0 %	100 %
250 µM	48,5 ± 5,8 %	30,0 ± 1,2 %	21,5 ± 4,9 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 35: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der *KRAS*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	HNE-Schädigung			
<i>KRAS</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	94,1 ± 1,2 %	3,7 ± 1,2 %	2,2 ± 0,5 %	100 %
100 µM	81,4 ± 2,7 %	12,0 ± 2,0 %	6,6 ± 0,8 %	100 %
150 µM	66,2 ± 4,5 %	22,1 ± 5,0 %	11,7 ± 1,4 %	100 %
200 µM	55,8 ± 8,2 %	27,6 ± 3,4 %	16,6 ± 4,9 %	100 %
250 µM	51,6 ± 6,5 %	29,9 ± 5,6 %	18,5 ± 4,7 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 36: HNE-geschädigte Primärzellen: Lage der *TP53*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

Primärzellen	HNE-Schädigung			
<i>TP53</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	96,3 ± 2,3 %	2,8 ± 1,5 %	0,9 ± 1,0 %	100 %
100 µM	86,0 ± 7,1 %	10,2 ± 4,7 %	3,8 ± 2,6 %	100 %
150 µM	72,1 ± 4,4 %	18,5 ± 2,7 %	9,4 ± 2,0 %	100 %
200 µM	54,6 ± 9,2 %	29,1 ± 1,4 %	16,3 ± 8,8 %	100 %
250 µM	36,9 ± 9,0 %	30,7 ± 4,1 %	32,4 ± 8,4 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 4).

Tabelle 37: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
APC-Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	93,5 ± 4,5 %	3,7 ± 2,1 %	2,8 ± 3,1 %	100 %
18,8 µM	87,1 ± 3,2 %	10,3 ± 2,7 %	2,6 ± 1,2 %	100 %
37,5 µM	79,2 ± 2,5 %	15,4 ± 1,4 %	5,4 ± 3,2 %	100 %
75,0 µM	56,2 ± 11,5 %	28,1 ± 6,3 %	15,7 ± 5,3 %	100 %
150 µM	46,6 ± 4,2 %	29,1 ± 4,8 %	24,3 ± 7,0 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 38: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
KRAS-Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	95,5 ± 3,9 %	3,5 ± 3,2 %	1,0 ± 0,8 %	100 %
18,8 µM	89,8 ± 1,7 %	8,2 ± 1,2 %	2,0 ± 1,0 %	100 %
37,5 µM	80,6 ± 3,9 %	13,4 ± 1,9 %	6,0 ± 2,1 %	100 %
75,0 µM	71,1 ± 3,8 %	19,3 ± 4,0 %	9,6 ± 0,3 %	100 %
150 µM	61,8 ± 11,1 %	25,8 ± 7,3 %	12,4 ± 4,3 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 39: H₂O₂-geschädigte LT97-Zellen: Lage der TP53-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	H ₂ O ₂ -Schädigung			
TP53-Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
PBS-Kontrolle	97,4 ± 1,2 %	2,3 ± 1,5 %	0,3 ± 0,6 %	100 %
18,8 µM	90,6 ± 4,1 %	7,1 ± 3,1 %	2,3 ± 1,5 %	100 %
37,5 µM	83,1 ± 2,1 %	13,3 ± 0,6 %	3,6 ± 1,9 %	100 %
75,0 µM	71,2 ± 6,3 %	21,4 ± 7,4 %	7,4 ± 1,6 %	100 %
150 µM	64,4 ± 13,4 %	22,0 ± 7,0 %	13,6 ± 8,9 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 40: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der APC-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	Hexenalschädigung			
APC-Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	96,7 ± 1,6 %	2,2 ± 0,6 %	1,1 ± 1,0 %	100 %
400 µM	90,5 ± 1,5 %	7,3 ± 1,9 %	2,2 ± 0,8 %	100 %
800 µM	70,8 ± 11,7 %	21,0 ± 5,9 %	8,2 ± 6,6 %	100 %
1200 µM	55,2 ± 9,0 %	29,3 ± 3,1 %	15,5 ± 6,0 %	100 %
1600 µM	52,1 ± 9,5 %	29,4 ± 3,9 %	18,5 ± 6,2 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 41: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der KRAS-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	Hexenalschädigung			
KRAS-Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	92,8 ± 0,7 %	5,7 ± 1,1 %	1,5 ± 0,7 %	100 %
400 µM	84,9 ± 5,5 %	12,1 ± 4,1 %	3,0 ± 1,4 %	100 %
800 µM	76,2 ± 6,6 %	18,1 ± 3,2 %	5,7 ± 3,4 %	100 %
1200 µM	67,0 ± 4,0 %	23,4 ± 5,7 %	9,6 ± 2,6 %	100 %
1600 µM	56,2 ± 3,1 %	29,7 ± 3,6 %	14,1 ± 6,1 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 42: Hexenal-geschädigte LT97-Zellen: Lage der *TP53*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	Hexenalschädigung			
<i>TP53</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
DMSO-Kontrolle	97,7 ± 1,4 %	1,7 ± 0,7 %	0,6 ± 0,8 %	100 %
400 µM	81,0 ± 6,0 %	13,2 ± 4,2 %	5,8 ± 1,9 %	100 %
800 µM	69,5 ± 3,0 %	20,6 ± 4,3 %	9,9 ± 1,8 %	100 %
1200 µM	51,9 ± 8,1 %	29,1 ± 3,8 %	19,0 ± 5,4 %	100 %
1600 µM	49,3 ± 7,1 %	28,7 ± 2,8 %	22,1 ± 4,3 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 4).

Tabelle 43: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der *APC*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	HNE-Schädigung			
<i>APC</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	95,1 ± 2,1 %	3,9 ± 2,4 %	1,0 ± 0,5 %	100 %
100 µM	87,4 ± 2,1 %	9,3 ± 2,3 %	3,3 ± 1,8 %	100 %
150 µM	78,7 ± 6,0 %	16,2 ± 5,0 %	5,1 ± 1,1 %	100 %
200 µM	67,5 ± 8,2 %	23,2 ± 4,9 %	9,3 ± 3,3 %	100 %
250 µM	54,8 ± 15,4 %	31,2 ± 6,1 %	14,0 ± 9,9 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 44: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der *KRAS*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	HNE-Schädigung			
<i>KRAS</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	95,7 ± 1,2 %	3,2 ± 1,6 %	1,1 ± 0,5 %	100 %
100 µM	90,0 ± 3,4 %	7,8 ± 2,9 %	2,2 ± 1,3 %	100 %
150 µM	79,0 ± 4,3 %	14,3 ± 2,6 %	6,7 ± 4,0 %	100 %
200 µM	70,4 ± 3,3 %	21,1 ± 2,6 %	8,5 ± 2,4 %	100 %
250 µM	58,2 ± 2,3 %	26,9 ± 0,3 %	14,9 ± 2,5 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Tabelle 45: HNE-geschädigte LT97-Zellen: Lage der *TP53*-Signale in den ausgewerteten Zellen.

LT97-Zellen	HNE-Schädigung			
<i>TP53</i> -Sonde	Kopf-Kopf	Kopf-Schweif	Schweif-Schweif	Summe
EtOH-Kontrolle	96,0 ± 3,3 %	2,7 ± 2,5 %	1,3 ± 1,1 %	100 %
100 µM	76,5 ± 7,2 %	16,3 ± 4,7 %	7,2 ± 2,6 %	100 %
150 µM	56,9 ± 10,6 %	22,9 ± 5,3 %	20,2 ± 8,0 %	100 %
200 µM	40,3 ± 7,7 %	33,6 ± 4,3 %	26,1 ± 4,0 %	100 %
250 µM	35,3 ± 8,6 %	28,0 ± 2,5 %	36,7 ± 7,1 %	100 %

Angaben als MW ± SD (n = 3).

Anhang III: Abbildungen

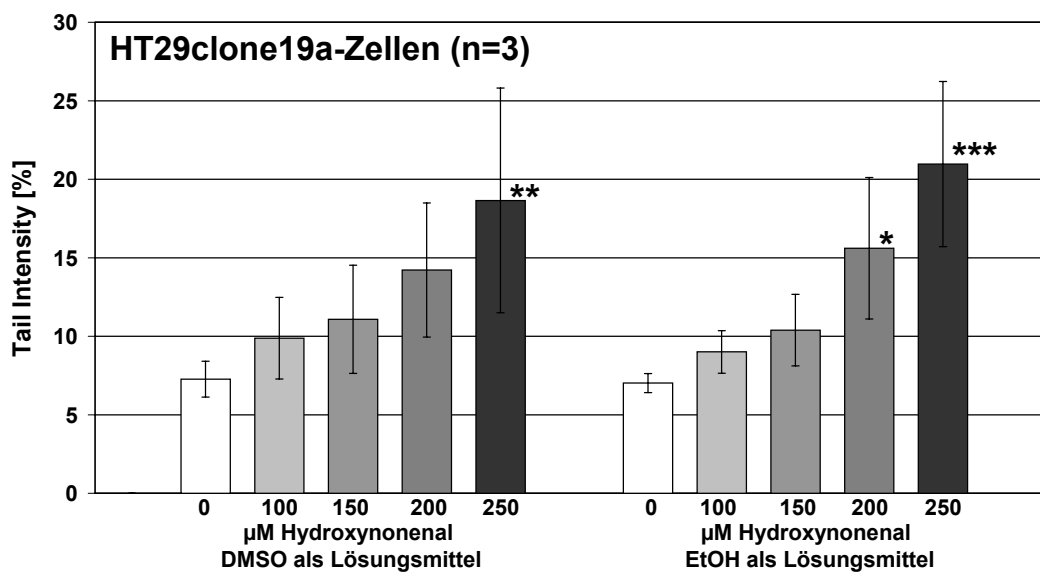


Abbildung 70: Vergleich von DMSO- und Ethanol als Lösungsmittel für HNE. Schädigung von HT29clone19a-Zellen.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

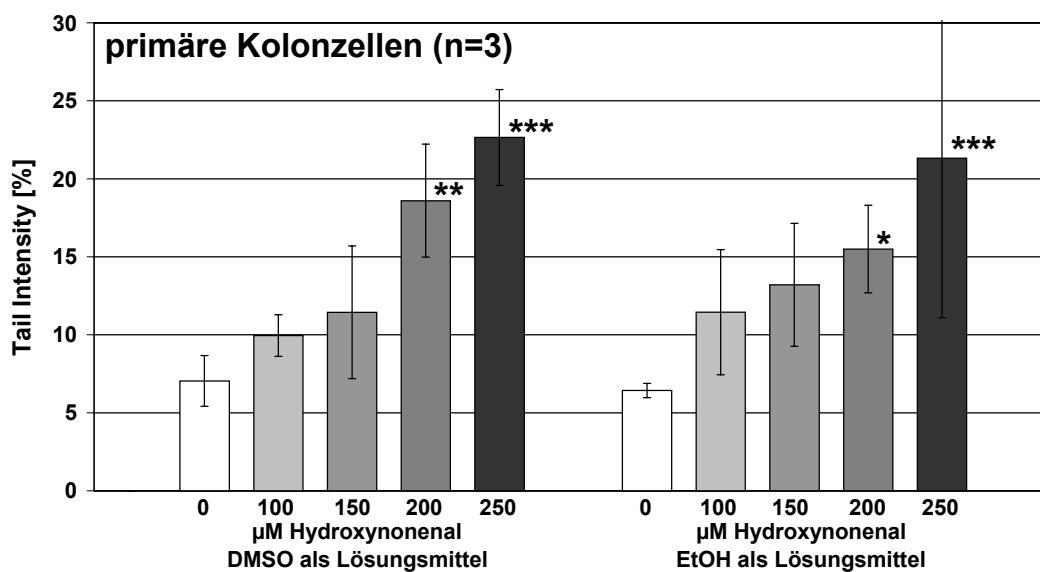


Abbildung 71: Vergleich von DMSO- und Ethanol als Lösungsmittel für HNE. Schädigung von primären Kolonzellen.

Angaben als MW \pm SD. Behandlung versus Kontrolle: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

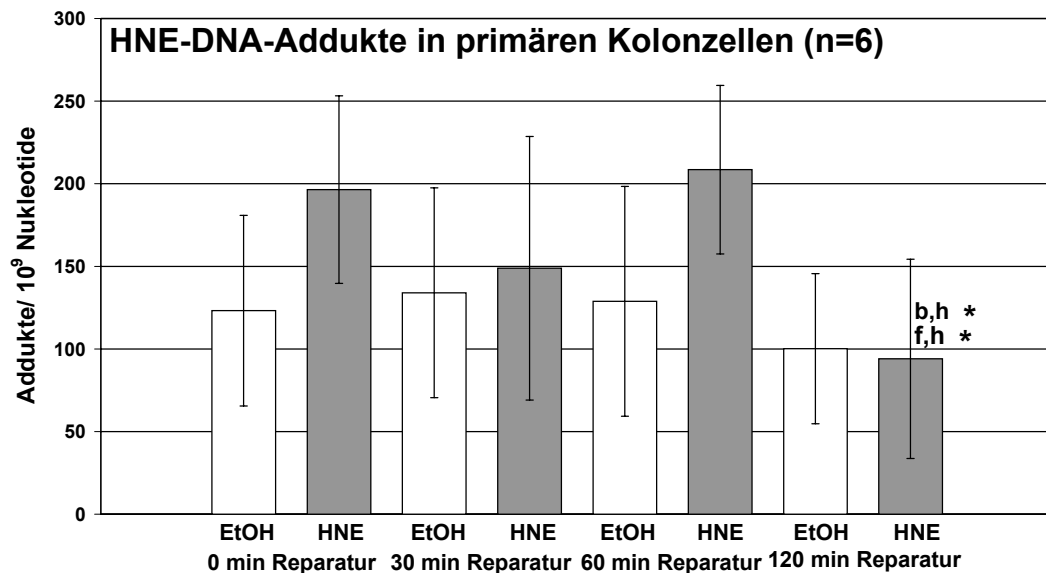


Abbildung 72: Propano-dG-Addukte während der Reparatur von DNS-Schäden in primären Kolonzellen nach Schädigung mit 150 μ M HNE (0-120 min Reparatur). Zusammenfassung von Versuchen, die mit Ethanol- bzw. DMSO-gelöstem HNE durchgeführt wurden.

Angaben als MW \pm SD. b,h *: signifikanter Unterschied zwischen den Addukt Mengen in den behandelten Primärzellen nach 30 min und 120 min; f,h *: signifikanter Unterschied zwischen den Addukt Mengen in den behandelten Primärzellen nach 60 min und 120 min. * $p < 0,05$ (signifikant in One-way-ANOVA mit Bonferroni-Posttest).

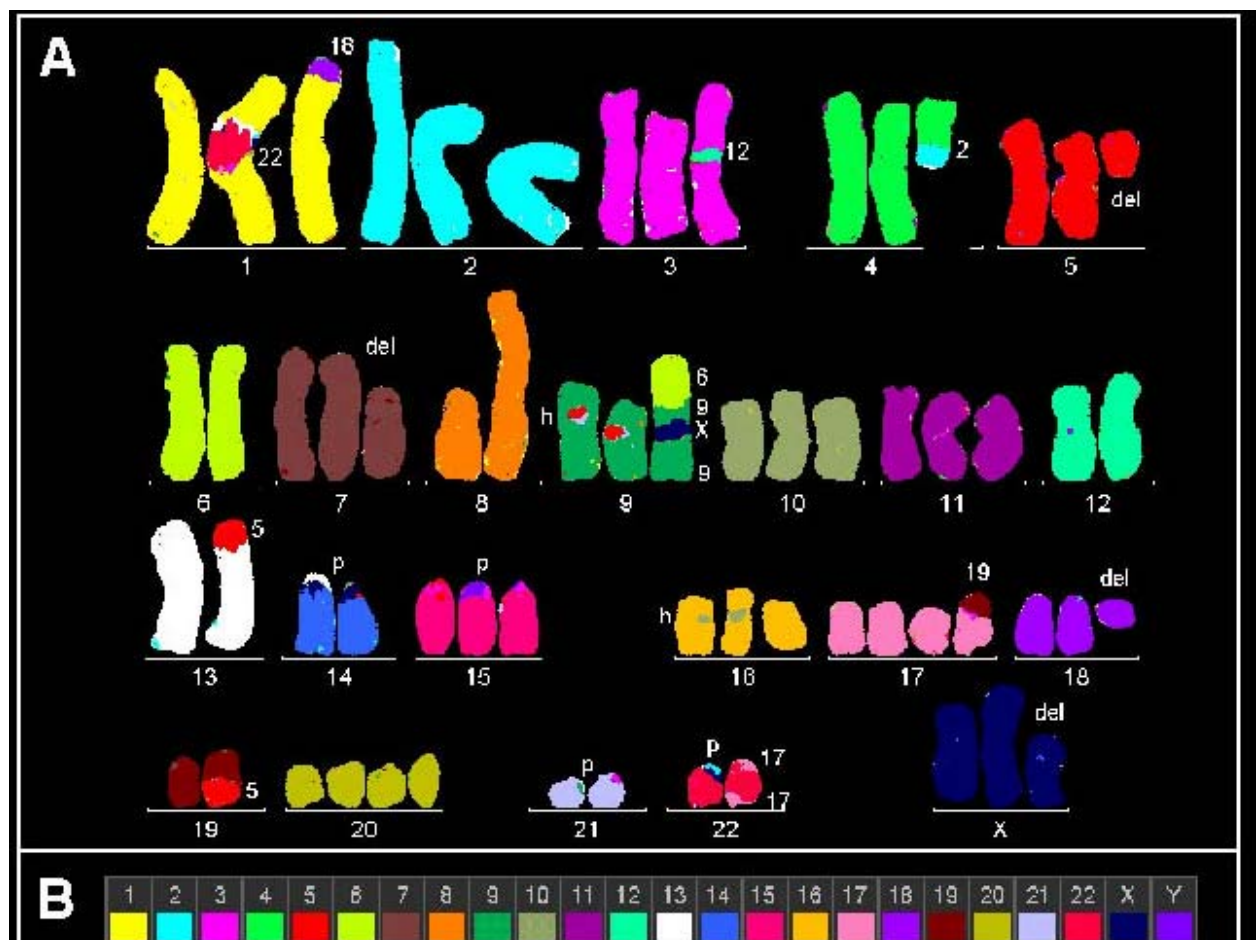


Abbildung 73: Falschfarbendarstellung einer Metaphase der HT29clone19a-Zelllinie (24-Farben-FISH) [Kuechler et al., 2003].

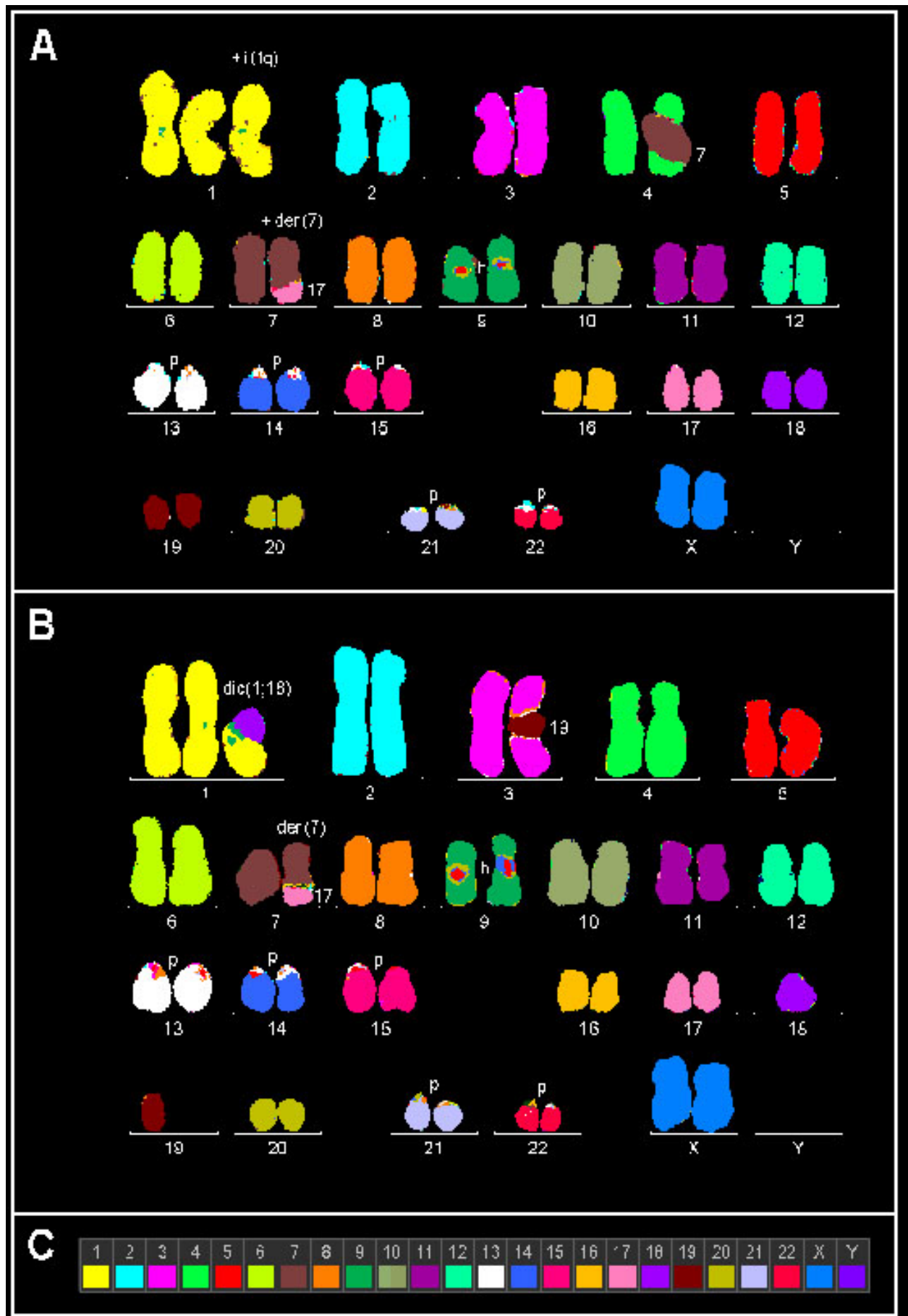


Abbildung 74: Falschfarbendarstellungen von Metaphasen der beiden in gleichen Teilen in der LT97-Zelllinie vorliegenden Klone (24-Farben-FISH) [Schaeferhenrich et al., 2003b].

a) Karyogramm von Klon 1, b) Karyogramm von Klon 2, c) Darstellung der Pseudofarben für jedes einzelne Chromosom.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Jena, den

Anja Schäferhenrich

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die direkt und indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir während meiner Promotion unterstützend zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Beatrice Pool-Zobel, die mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante und vielseitige Promotionsthema am Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie zu bearbeiten. Prof. Pool-Zobel hat mir durch ihre Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion stets neue Impulse für meine Arbeit gegeben und dadurch wesentlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Während der Zeit als Doktorandin am Lehrstuhl konnte ich in Bezug auf das wissenschaftliche und molekularbiologische Arbeiten viel lernen.

Dr. Wolfgang Sendt und Prof. Johannes Scheele aus der Klinik für allgemeine und viszerale Chirurgie der FSU Jena danke ich für die Bereitstellung der Kolongewebeproben. Erst dadurch sind die grundlegenden Arbeiten mit den primären humanen Kolonzellen, die einen wichtigen Aspekt der Arbeit darstellten, möglich geworden. Wesentliche Unterstützung habe ich auch durch Alexander Rapp vom IMB Jena erfahren, bei dem ich die Comet-FISH-Methode gelernt habe und der bei Schwierigkeiten jederzeit ein Ansprechpartner war. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Alma Küchler, Anja Weise, Susanne Michel und Prof. Uwe Claussen vom Institut für Humangenetik und Anthropologie der FSU Jena bedanken, die mir durch die Karyotypisierung der HT29clone19a- und LT97-Zellen sowie durch die Herstellung der Gen-Sonden für die Comet-FISH-Versuche sehr geholfen haben. Dr. Shamci Monajembashi vom IMB Jena hat mir mit viel Geduld bei der Laser-Catapulting-Mikrodissektion und der Eppendorff-Mikrodissektion geholfen. Ein Dank geht auch an Matthias Wacker, Paul Wanek und Prof. Erwin Eder vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, die HNE- Dimethylacetal zur Verfügung gestellt und die Propano-dG-Addukte in den HNE-behandelten primären Kolonzellen analysiert haben. Abschließend danke ich nochmals allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungstoxikologie für die stets gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen meinen Freunden und meiner Mutter Sieglinde Schäferhenrich für die Motivation und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Lebenslauf

1978-1982	Grundschule Hohnsen in Hildesheim
1982-1991	Gymnasium Andreanum in Hildesheim
29/05/1991	Abitur, Note 1,5
1991-1994	Chemiestudium an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
22/04/1994	Vordiplom, Gesamturteil „sehr gut“
1994-1996	Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Studienrichtung Umweltchemie
01/1997-11/1997	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie (Friedrich-Schiller-Universität Jena) sowie am Laboratory of Technological Processes (Warsaw University of Technology) „Analytische und prozeßanalytische Untersuchung einer technischen Salicylaldehydsynthese“, Note 1,0
13/11/1997	Diplom, Gesamturteil „sehr gut“
01/1998-12/1998	Arbeit als wiss. Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Forschungsbereich Hochtemperaturreaktionen
05/1999-06/1999	Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie
01/1999-12/2002	Berufsbegleitendes Postgradualstudium „Toxikologie und Umweltschutz“ an der Universität Leipzig
07/1999-05/2004	Promotion am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Lehrstuhl für Ernährungstoxikologie „Untersuchungen zu Mechanismen der ernährungsbedingten Kolonkarzinogenese: Genspezifische Schäden in humanen Kolonzellen durch endogene Risikofaktoren“
01/2003-03/2003	Arbeitsaufenthalt an der University of Coleraine, Northern Ireland (Marie-Curie-Stipendium)

Veröffentlichungen

Schaeferhenrich A, Beyer-Sehlmeyer G, Festag G, Kuechler A, Haag N, Weise A, Liehr T, Claussen U, Marian B, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL. Human adenoma cells are highly susceptible to the genotoxic action of 4-hydroxy-2-nonenal. *Mutat Res.* 2003 May 15;**526**(1-2):19-32.

Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U, Rapp A, Greulich KO, Pool-Zobel BL. Putative colon cancer risk factors damage global DNS and *TP53* in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol.* 2003 May;**41**(5):655-64.

Kuechler A, Weise A, Michel S, Schaeferhenrich A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T. Precise breakpoint characterization of the colon adenocarcinoma cell line HT-29 clone 19A by means of 24-color fluorescence in situ hybridization and multicolor banding. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Feb;**36**(2):207-10.

Ebert MN, Klinder A, Peters WH, Schaferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis.* 2003 Oct;**24**(10):1637-44. Epub 2003 Aug 01.